

Correlação entre a distribuição dos derivados do ácido protocatecuico e a sua eficácia no combate à oxidação lipídica

Rui Pedro Monteiro da Silva

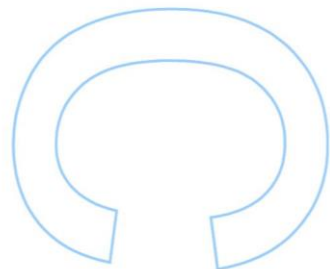
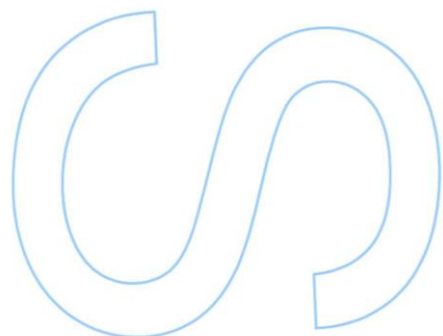
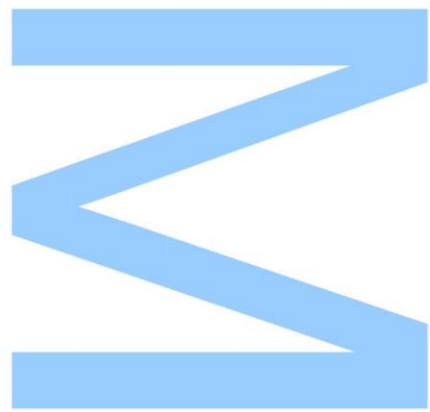
Tecnologia e Ciência Alimentar
Departamento de Química e Bioquímica
2016

Orientador

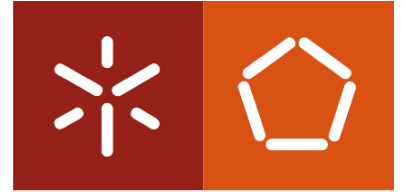
Doutora Maria de Fátima Paiva Martins
Professora Auxiliar, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Coorientador

Doutor Carlos Bravo-Díaz,
Professor Catedrático, Faculdade de Química da Universidade de Vigo



Universidade de Vigo



Escola de Engenharia

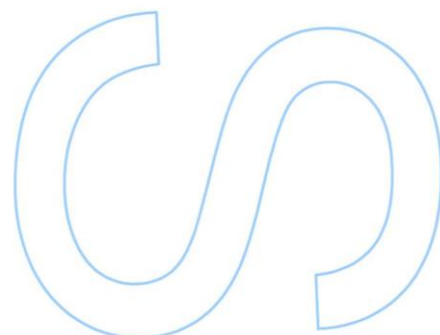
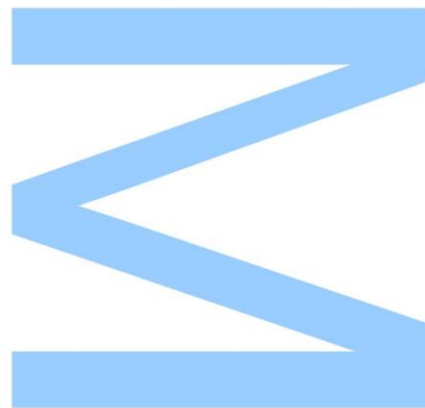
Universidade do Minho



Todas as correções determinadas
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Agradecimentos

Ao longo destes anos, conheci pessoas que me marcaram de várias maneiras, umas muito, outras pouco, umas melhor e outras não tão bem.

Tudo serviu para aprender a viver, e isso é a melhor recompensa, crescermos com as nossas vivências.

À Profª Doutora **Fátima Paiva-Martins**, que durante estes anos acreditou no meu trabalho e me auxiliou, pela paciência para comigo, pelos conselhos, por todas as conversas e ensinamentos que me passou, o meu muito obrigado.

Ao Prof Doutor **Carlos Bravo-Díaz**, que me acolheu no meu estágio Erasmus, na Universidade de Vigo, que me ensinou e mostrou outras perspectivas da área da Química, o meu obrigado.

Aos meus colegas de laboratório, ao longo destes anos, que contribuíram para que aprendesse a lidar com o mundo de trabalho, nos bons e maus momentos.

A uma pessoa muito especial, que nunca me deixou desistir, sempre esteve do meu lado, que teve a maior paciência do mundo comigo, e nunca mas por nunca me deixou ir abaixo, o meu grande obrigado, pois sem esta preciosíssima ajuda, nada seria possível.

Aos **meus amigos**, vindos de todas as partes, que nunca me deixaram e contribuíram para recordar os melhores momentos da minha vida, que ficarão sempre na memória.

E por fim, mas não menos importante, o maior agradecimento aos meus pais, **Manuel e Conceição**, e aos meus tios **Fernando e Fernanda**.

Aos meus pais, por nunca me faltarem com nada, por fazerem tudo o possível para que continuasse e que um dia possa pagar-vos de volta todo este sacrifício.

Aos meus tios, que fizeram e fazem o que mais ninguém faria, que me acolhem na sua casa e nas suas vidas há 6 anos, que fazem muito da vida deles sempre a pensar em mim e que nunca se esquecem de mim, em qualquer situação.

NADA NESTE MUNDO PODERÁ PAGAR POR TUDO O QUE FIZERAM.

Dar a vida seria pouco, por isso, o maior obrigado (e sendo muito pouco) é destinado a eles.

Resumo

A solubilidade de muitos antioxidantes de origem biológica em água é elevada, o que torna estes compostos limitados em meios oleosos e emulsionados. Assim tem surgido a necessidade de encontrar novos antioxidantes com diferentes solubilidades, no entanto que possuam uma actividade antiradicalar semelhante. Segundo esta linha, foram sintetizados vários ésteres do ácido protocatecuico com recurso a álcoois alifáticos de tamanhos diferentes (desde o metanol ao hexadecanol), por reacção de esterificação. Os rendimentos das sínteses foram entre 9,21% no caso do C14PCA e 91,64% no caso do C1PCA. Também se verificou que apenas com o recurso a uma temperatura de 80°C foi possível a obtenção dos ésteres de cadeia longa, ao contrário da reacção a temperatura ambiente para a obtenção dos ésteres de cadeia curta.

Os antioxidantes foram assim testados em emulsões água/Tween 20/óleo de soja, podendo ser encontrados nas várias fases aquosa, oleosa e interfacial. Neste trabalho aplicou-se um método cinético que não requer o isolamento de cada uma das fases para quantificar as constantes de partição. Este método baseia-se no modelo cinético da pseudofase aplicado a emulsões termodinamicamente estáveis, através da reacção do antioxidante com um sal de carácter peculiar, tetrafluorborado de hexadecilarenodiazónio, cuja solubilidade em meio oleoso e aquoso é nula, estando este presente apenas na interface.

A constante de velocidade (k_{obs}) da reacção anterior é monitorizada através de um método indirecto de derivatização, a partir da reacção dos iões hexadecilarenodiazónio que não reagiram com o antioxidante e um agente acoplante, dicloridrato de N-(naft-1-il)etilenodiamina (NED), que por reacção de acoplamento diazótico, origina um corante estável de cor roxa.

Verificou-se assim que a hidrofobicidade dos ésteres do ácido protocatecuico aumenta com o aumento da cadeia alquílica, dado o aumento da constante de partição em sistema binário água: óleo de soja P_A^O .

A distribuição dos ésteres do ácido protocatecuico é muito semelhante, mesmo em tamanhos de cadeia alquílica extremas. O protocatecuato de etilo (C2PCA) distribui-se pelas três regiões da emulsão, obtendo assim duas constantes de partição P_A^I e P_O^I , obtendo assim os valores de $P_A^I = 517 \pm 102$ e $P_O^I = 227 \pm 44$. Os restantes antioxidantes avaliados, os protocatecuatos de butilo (C4PCA), hexilo (C6PCA), octilo (C8PCA), decilo (C10PCA), dodecilo (C12PCA) e hexadecilo (C16PCA), denominados antioxidantes lipofílicos, apenas se distribuem pela fase oleosa e interfacial, sendo assim obtido o valor de P_O^I , sendo este valor de P_O^I (C4PCA) = 198 ± 80 , P_O^I (C8PCA) = 200 ± 54 , P_O^I (C10PCA) = 158 ± 51 , P_O^I

(C12PCA) = 136 ± 13 e P_O^I (C16PCA) = 104 ± 18 .

Com o aumento da cadeia alquilo, verificou-se uma tendência do aumento de P_O^I , atingindo um pico máximo no C8PCA, embora não seja muito evidente esse aumento, dado os valores serem muito próximos entre si. A partir das constantes de partição em P_O^I e P_A^I foi possível quantificar a percentagem de antioxidante em cada uma das fases da emulsão. À excepção do C16PCA, os antioxidantes estão presentes a níveis muito semelhantes ao longo do aumento da fracção de emulsionante (ϕ_i), em que a valores de ϕ_i mais baixos (0,005), a percentagem de antioxidante na fase interfacial ronda os 70%, sendo que para o C16PCA este seja de 55%, e à medida que há um aumento de ϕ_i , há uma tendência destes a aumentar, atingindo um máximo de 90% para todos, para valores de ϕ_i mais altos (0,04).

A avaliação da eficiência antioxidante destes compostos foi efectuada com recurso ao método de DPPH e ao teste de estufa de Schaal.

O método de DPPH é um método desenvolvido em meio homogéneo (neste caso, metanol) e concluiu-se não haverem diferenças significativas na actividade antiradicalar dos derivados do ácido protocatecuico frente ao radical DPPH, dado que não houveram alterações à estrutura catecólica dos mesmos. Assim, despistou-se qualquer influência do grupo catecol na reactividade dos antioxidantes em emulsões, concluindo que as diferenças na actividade antioxidante dos mesmos apenas se deve à sua distribuição nas mesmas.

A eficácia antioxidante em emulsões foi assim avaliada a partir do teste de estufa de Schaal. Neste caso verificou-se que os vários antioxidantes tiveram uma actividade muito similar entre eles, não se mostrando uma evolução acentuada, correspondendo a um comportamento similar à distribuição dos mesmos compostos, nas mesmas emulsões. Assim verificou-se que estes antioxidantes não obedecem ao paradoxo polar, dado que o composto mais lipofílico (C16PCA) não é o mais eficiente na estabilidade da oxidação.

Abstract

Many biologic-origin antioxidants are highly water-soluble and makes them useless in oils and emulsions. So, it's important to find new antioxidants, with different solubilities but the same antioxidant strength. Following these lines, we synthesized a sort of protocatechuic acid esters, with different size chains' alcohol (since methanol until hexadecanol), by esterification.

The synthesis' yields were between 9,21% for C14PCA and 91,64% for C1PCA. We conclude that esterification with long chain alcohols only was possible with using a high temperature, like 80°C, unlike short chain alcohols which were synthesized at room temperature.

The new antioxidants were tested in water/Tween 20/soybean oil emulsions, and they can be found in all the emulsions' phases: aqueous, oil and interfacial. In this work, it was applied a kinetic method which doesn't require an isolation of emulsion's phase to quantify partition's constants. The method is based on thermodynamic-stable emulsions applied pseudophase kinetic method, through the chemical reaction between antioxidants and a special characteristic salt, hexadecylarenodiazonium tetrafluoroborate, which oil and aqueous solubilities are minimal, so, only starting on interface.

The previous reactional velocity constant (k_{obs}) is monitored through an indirect derivatization method, between the unreacted hexadecylarenodiazonium ions and a coupling agent, *N*-1-yl-ethylenediamine (NED), which obtained a purple color indicator, through an azoic coupling reaction.

We verified that protocatechuic acid esters' hydrophobicity increase with the alkyl chain's increase, as we see in binary system water:soybean oil partition constant P_A^O .

The esters' distribution in emulsions is too similar, even in extreme chain length's esters. Ethyl protocatechuic acid (C2PCA) distributes between all the emulsion regions, obtaining two partition constants P_A^I and P_O^I , as well, obtaining the values like $P_A^I = 517 \pm 102$ and $P_O^I = 227 \pm 44$. The other compounds, buthyl (C4PCA), octyl (C8PCA), decyl (C10PCA), dodecyl (C12PCA) and hexadecyl (C16PCA) protocatechuates, named as lipophilic antioxidants, only can be found in oil phase and interface, obtaining as well the values of P_O^I , as P_O^I (C4PCA) = 198 ± 80 , P_O^I (C8PCA) = 200 ± 54 , P_O^I (C10PCA) = 158 ± 51 , P_O^I (C12PCA) = 136 ± 13 e P_O^I (C16PCA) = 104 ± 18 .

With increasing alkyl chain, we obtained an increasing P_O^I , reaching a peak in C8PCA, although it is not evident as the values are close together. From partition constants P_A^I and P_O^I , it was possible to quantify the percentage of antioxidant in each emulsion's phase. With the exception of C16PCA, antioxidants are present at very similar levels

throughout the increased emulsifier fraction (ϕ_i), wherein lower ϕ_i (0.005), the percentage of antioxidant in the interfacial layer is around 70%, and for 55% for C16PCA, and as increases ϕ_i the percentage increases too, reaching a maximum of 90% for highest values of ϕ_i (0.04).

The assessment of antioxidant effectiveness of these compounds was carried out using DPPH method and Schaal oven test.

The DPPH method is developed in homogeneous phase (in this case, methanol) and it was concluded not they had significant differences in the antiradical activity of protocatechuic acid derivatives against DPPH, since there were no changes to catechol structure. As we obtained the same reactivity in different alkyl chains' esters, we conclude that differences in the antioxidant activity only occurs because of distribution in emulsions.

The antioxidant efficacy in emulsions was evaluated from the Schaal oven test. In this case it was found that the various antioxidants had a very similar activity among them, not showing a sharp change, corresponding to a behavior similar distribution of these compounds in the same emulsions. Thus it was found that these antioxidants do not obey the polar paradox, since the most lipophilic compound (C16PCA) is not the most efficient in oxidation stability.

Índice

Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract	ix
Índice de Figuras	xiii
Índice de Tabelas	xv
Lista de Abreviaturas	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Oxidação Lipídica - Contextualização	2
1.1.1. Autooxidação	2
1.1.2. Decomposição de Hidroperóxidos	4
1.1.3. Oxidação Lipídica em Emulsões	4
1.2. Antioxidantes	7
1.2.1. Ácidos fenólicos – ácido protocatecuico	8
1.2.2. Obtenção de derivados lipofílicos do ácido protocatecuico por esterificação	9
1.3. Avaliação da capacidade antiradicalar – Método de DPPH• ²¹	12
1.4. Avaliação da actividade antioxidante – Teste de Estufa de Schaal	14
1.5. Distribuição de Antioxidantes	15
1.5.1. Determinação das constantes de partição dos antioxidantes em sistemas binários ²⁵	15
1.5.2. Determinação das constantes de partição dos antioxidantes em sistemas emulsionados	16
2. OBJECTIVO	27
3. METODOLOGIA E PROCEDIMENTOS	29
3.1. Métodos e reagentes de síntese	30
3.2. Síntese de Protocatecuatos	31
3.2.1. Obtenção dos protocatecuatos de cadeia curta ³⁴	32
3.2.2. Obtenção dos protocatecuatos de cadeia longa	33
3.3. Remoção dos antioxidantes dos óleos alimentares usados na preparação das emulsões	34
3.3.1. Obtenção dos ésteres metílicos dos ácidos gordos e sua análise por cromatografia gasosa	34
3.4. Determinação das constantes de partição em misturas binárias água:óleo de soja ³⁶	35
3.5. Determinação de EC ₅₀ a partir do método de DPPH•	36
3.6. Determinação da capacidade antiradicalar através do Teste de Estufa de Schaal	37
3.7. Determinação da distribuição de ésteres protocatecuatos em emulsões	38
3.7.1. Síntese de tetrafluroborato de hexadecilarenodiazónio	38
3.7.2. Preparação de Emulsões	38
3.7.3. Preparação da solução de NED	39
3.7.4. Determinação das constantes de velocidade k _{obs}	39
4. TRATAMENTO DE RESULTADOS	41
4.1. Síntese dos protocatecuatos por catálise ácida	42

4.1.1.	Caracterização dos ésteres derivados do ácido protocatecuico	43
4.2.	Determinação da composição em ácidos gordos de óleos alimentares por cromatografia gasosa	47
4.3.	Determinação da capacidade antiradicalar: Método de DPPH*	48
4.4.	Determinação da eficácia antioxidante em emulsões: Teste de Estufa de Schaal	50
4.5.	Determinação das constantes de Partição P_A^O , em sistemas binários água:óleo de soja ...	52
4.6.	Determinação das constantes de Partição P_A^I e P_O^I em sistemas emulsionados água/tween 20/óleo de soja, a partir do modelo cinético de pseudofase	53
4.6.1.	Análise da distribuição do C2PCA segundo o modelo cinético de pseudofase	53
4.6.2.	Análise da distribuição do C4PCA, C8PCA, C10PCA, C12PCA e C16PCA segundo o modelo cinético de pseudofase simplificado	57
4.7.	Análise comparativa da correlação entre a actividade antioxidante e a distribuição dos derivados ésteres do ácido protocatecuico	65
5.	CONCLUSÕES	67
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

Índice de Figuras

Figura 1: Ruptura homolítica de ácidos gordos	3
Figura.2: Formação de hidroperóxidos (1) e propagação da cadeia (2 e 3)	3
Figura.3: Mecanismo de terminação da oxidação lipídica	3
Figura.4: Reacção de decomposição de hidroperóxidos catalisada por metais	4
Figura 5: Estrutura química do palmitato de ascorbilo	5
Figura.6: Reacção de transferência de hidrogénio em antioxidantes	7
Figura.7: Reacção de radicais com os antioxidantes (transferência de hidrogénio)	7
Figura.8: Estrutura química do ácido protocatecuico	9
Figura 9: Protonação do grupo carbonilo.....	10
Figura 10: Formação de derivados tetraédricos de transição	10
Figura 11: Formação do grupo O-R e consequente formação do grupo de saída H ₂ O	11
Figura 12: Obtenção de ésteres protocatecuatos com regeneração do catalisador	11
Figura 13: Reacção de Redução do radical DPPH• na presença de um antioxidante (AH)	12
Figura 14: Espectros de Absorção UV-Visível da monitorização do método de DPPH• e da sua reacção com um antioxidante.	12
Figura.15: Esquema da distribuição de um antioxidante (AO) numa mistura binária O/A	15
Figura 16: Representação esquemática de uma emulsão, enunciando todas as interações entre fases	17
Figura 17: Representação esquemática de uma emulsão, e da reacção de 16-Ar-N ₂ ⁺ com o AO presente na interface	19
Figura 18: Representação esquemática de uma emulsão com um antioxidante lipofílico e sua reacção com 16-Ar-N ₂ ⁺	22
Figura 19: Representação esquemática de uma emulsão com um antioxidante hidrofílico e sua reacção com 16-Ar-N ₂ ⁺	24
Figura 20: Estrutura química do ácido protocatecuico e dos seus derivados	28
Figura 21: Reacção de esterificação do ácido protocatecuico	31
Figura 22: Esquema numerado para a interpretação dos espectros de RMN para os ésteres sintetizados	43
Figura 23: Representação gráfica de A (λ=515 nm) = f (t) da reacção entre DPPH• e C1PCA.....	48
Figura 24: Representação de %DPPH = f(C1PCA : DPPH•), para cada diferentes tempos de reacção	49
Figura 25: N° de dias para que as emulsões atinjam 0,6% em dienos conjugados, na presença dos vários antioxidantes, a uma temperatura de 37°C.....	50
Figura 26: Tempo necessário para que as emulsões atinjam 0,6% de dienos conjugados, em função do tamanho da cadeia alquílica introduzida.....	51
Figura 27: Gráfico representativo da reacção de AO com 16-Ar-N ₂ ⁺	54
Figura 28: Representação de k _{obs} e 1/k _{obs} vs φ _i com os respectivos ajustes à equação 29, em 1.5.1.1., do C2PCA	55
Figura 29: Variação da percentagem de C2PCA nas várias fases da emulsão.	56

Figura 30: Gráfico representativo da reacção de AO com 16-Ar-N_2^+	58
Figura 31: Representação de k_{obs} e $1/k_{\text{obs}}$ vs ϕ_I com os respectivos ajustes às equações 38 e 39 em 1.5.1.2., do C4PCA	58
Figura 32: Representação de k_{obs} e $1/k_{\text{obs}}$ vs ϕ_I com os respectivos ajustes às equações 38 e 39 em 1.5.1.2., do C8PCA	59
Figura 33: Representação de k_{obs} e $1/k_{\text{obs}}$ vs ϕ_I com os respectivos ajustes às equações 38 e 39 em 1.5.1.2., do C10PCA	59
Figura 34: Representação de k_{obs} e $1/k_{\text{obs}}$ vs ϕ_I com os respectivos ajustes às equações 38 e 39 em 1.5.1.2., do C12PCA	60
Figura 35: Representação de k_{obs} e $1/k_{\text{obs}}$ vs ϕ_I com os respectivos ajustes às equações 38 e 39 em 1.5.1.2., C16PCA	60
Figura 36: Distribuição dos antioxidantes lipofílicos nas várias fases da emulsão	62
Figura 37: A: Distribuição da concentração interfacial em função da fracção de emulsionante ; B: Distribuição da concentração interfacial dos AO em função do tamanho da cadeia alquílica, para várias fracções de emulsionante	64
Figura 38: Representação da distribuição dos vários antioxidantes na interface	65
Figura 39: Correlação entre $(AO_I) = f(n^\circ\text{C})$ e tempo = $f(n^\circ\text{C})$	66

Índice de Tabelas

<i>Tabela 1: Estrutura de ácidos fenólicos e seu nome trivial</i>	8
<i>Tabela 2: Número de dias de reacção de cada composto sintetizado por catalisador H1</i>	33
<i>Tabela 3: Esquema da placa BD Falcon de 96 poços com as distribuições dos antioxidantes a analisar</i>	36
<i>Tabela 4: Resumo das sínteses dos ésteres protocatecuatos, com respectivos catalisadores e rendimentos</i>	42
<i>Tabela 5: Análise de Ácidos Gordos por cromatografia gasosa, e respectiva percentagem de cada constituinte</i>	47
<i>Tabela 6: Valores de EC_{50} para vários tempos de reacção</i>	49
<i>Tabela 7: Percentagens dos diferentes antioxidantes presentes na fase aquosa e oleosa de uma mistura binária 4:6 óleo de soja:água e o seu valor de constante de partição P_A^O</i>	52
<i>Tabela 8: Percentagem de C2PCA presente na fase aquosa e oleosa de uma mistura binária 4:6 óleo de soja:água e o seu valor de constante de partição P_A^O</i>	53
<i>Tabela 9: Parâmetros gráficos relativos ao ajuste da equação $k_{obs} = f(\phi_l)$</i>	55
<i>Tabela 10: Percentagens dos antioxidantes lipofílicos presentes na fase aquosa e oleosa de uma mistura binária 4:6 óleo de soja:água e o seu valor de constante de partição P_A^O</i>	57
<i>Tabela 11: Parâmetros gráficos relativos ao ajuste da equação $k_{obs} = f(\phi_l)$</i>	61
<i>Tabela 12: Parâmetros analisados para os antioxidantes lipofílicos, com base no modelo cinético de pseudofase simplificado</i>	61

Lista de Abreviaturas

RH: ácido gordo insaturado

R^\bullet : radical alquilo

ROO^\bullet : radical peroxilo

RO^\bullet : radical alcóxido

A/O: emulsão de água em óleo

O/A: emulsão de óleo em água

A^\bullet : radical proveniente do antioxidante

UV: ultravioleta

BHT: 2,6-diterc-butil-metilfenol

BHA: 2-terc-butil-4-hidroxianisol e 3-terc-butil-4-hidroxianisol

DPPH $^\bullet$: radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo

DPPH $_2$: 2,2-difenil-1-picril-hidrazina

TAH: transferência de átomos de hidrogénio

TE: transferência electrónica

Φ_O : fracção volúmica de óleo

Φ_A : fracção volúmica de água

16-Ar-N $_2^+$: ião hexadecilarenodiazónio

Φ_i : fracção volúmica de emulsionante

P_A^O : constante de partição óleo:água em sistemas binários

P_A^I : constante de partição interface:água em sistemas emulsionados

P_O^I : constante de partição interface:óleo em sistemas emulsionados

k: constante de velocidade

k_{obs} : constante de velocidade obtida por método experimental

k_i : constante de velocidade na interface

%AO $_O$: percentagem de antioxidante na região oleosa da emulsão

%AO $_A$: percentagem de antioxidante na região aquosa da emulsão

%AO $_i$: percentagem de antioxidante na região interfacial da emulsão

C1PCA: Protocatecuato de Metilo

C2PCA: Protocatecuato de Etilo

C3PCA: Protocatecuato de Propilo

C4PCA: Protocatecuato de Butilo

C6PCA: Protocatecuato de Hexilo

C8PCA: Protocatecuato de Octilo

C10PCA: Protocatecuato de Decilo

C12PCA: Protocatecuato de Dodecilo

C14PCA: Protocatecuato de Tetradecilo

C16PCA: Protocatecuato de Hexadecilo

TLC: cromatografia em camada fina (Thin Layer Chromatography)

^1H -RMN: Ressonância Magnética Nuclear de Protão

^{13}C -RMN: Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13

ESI-MS: Espectroscopia de ionização de massa electrospray (ElectroSpray Ionization-Mass Spectrofotometry)

UV/Vis: Ultravioleta/visível

NED: dicloridrato de N-(naft-1-il)etilenodiamina

THF: Tetraidrofurano

BuONO: Nitrito de butilo

AcN: Acetonitrilo

Et_2O : éter dietílico

ϵ : coeficiente de extinção molar

CD: dienos conjugados (Conjugated Dienes)

p-TsOH: ácido p-toluenossulfônico

A: Absorvância

A_{inf} : Absorvância a tempo “infinito” (absorvância residual)

1. INTRODUÇÃO

1.1. Oxidação Lipídica - Contextualização

A maior parte dos alimentos contém lípidos susceptíveis a reacções que destroem e modificam as propriedades dos alimentos como a lipólise, a autooxidação e a oxidação enzimática.¹

Os principais processos de deterioração provêm das reacções de oxidação e subsequente formação dos produtos de oxidação, sendo estes responsáveis por características desagradáveis no alimento, como o aroma e o sabor. Esta alteração provoca a diminuição do valor nutricional do alimento, bem como as suas propriedades organolépticas.

Uma das mais importantes reacções de degradação é a oxidação dos lípidos, pois é uma reacção que, por mais adversas que as condições sejam para que estas ocorram, é impossível evitá-las, deteriorando a qualidade dos alimentos desde a sua confeccção até ao consumo pelo ser humano. Quando acontece a oxidação, dá-se a formação de ranço, que quer para o consumidor quer para o técnico de análise, é uma causa importante de rejeição dos produtos. Por esta razão, o controlo das reacções de oxidação torna-se uma meta/aspecto essencial a ser cumprido.²

A fim de aumentar os tempos de prateleira dos alimentos, a sua qualidade desde o nível estético ao nível nutricional, mantendo as suas propriedades por tempos consideráveis, a indústria alimentar tem vindo a investigar todos os factores que afectam a degradação dos alimentos e de que modo se poderá controlar esses mesmos factores.

A velocidade de oxidação dos lípidos irá depender de vários factores ambientais a que está sujeito o alimento, das características dos lípidos que sofrem a oxidação e da composição química do alimento.

Assim, vários factores influenciam estas reacções tal como a estrutura dos lípidos, nomeadamente o número de insaturações, a presença de oxigénio, a luz, a temperatura e a presença de agentes antioxidantes e/ou pro-oxidantes.

1.1.1. Autooxidação

A autooxidação é um processo ininterrupto, dinâmico, puramente químico e

extremamente complexo, que envolve reacções de formação de radicais livres, catalizada por vários factores (temperatura, pH ou a presença de iões metálicos de transição).

Este processo de degradação lipídica compreende 3 fases: iniciação, propagação e terminação.³

A etapa de iniciação surge da perda de um hidrogénio no carbono insaturado de ácidos gordos insaturados (RH), catalisada por metais de transição, altas temperaturas ou luz, formando-se um radical alquilo (R').⁴



Figura 1: Ruptura homolítica de ácidos gordos

Na propagação, dá-se a formação de radicais peroxilo (ROO'), a partir da reacção de radicais alquilo (R') dos ácidos gordos com O₂.

Dado os radicais peroxilo serem demasiado instáveis, estes reagem com outras moléculas de ácidos gordos, formando hidroperóxidos (ROOH) e novos radicais alquilo.⁵



Figura 2: Formação de hidroperóxidos (2) e propagação da cadeia (3 e 4)

A fase de propagação é a mais longa, pois dura até à extinção do reagente limitante da reacção, neste caso concreto, os ácidos gordos insaturados que ainda não sofreram oxidação. Quando se dá essa extinção do reagente limitante, dá-se a etapa de terminação.

Esta etapa é caracterizada pela união de radicais alquilo e/ou peroxilo, entre si.

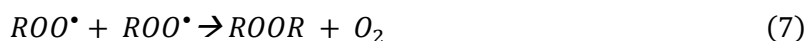


Figura 3: Mecanismo de terminação da oxidação lipídica

Existem outros meios de oxidação que seguem outros mecanismos, como a foto-oxidação e a oxidação enzimática, mas que normalmente não trazem problemas de ordem tecnológica, uma vez que os alimentos estão normalmente acondicionados em embalagens que não permitem a passagem de radiação ultravioleta e durante a refinação dos óleos alimentares todas as enzimas são eliminadas.

1.1.2. Decomposição de Hidroperóxidos

Os hidroperóxidos que se formaram inicialmente possuem cadeias longas alifáticas e não apresentam aroma nem sabor, no entanto, a quebra homolítica da ligação O-O do hidroperóxido ROOH forma dois radicais instáveis, o radical alcóxilo (RO•) e o radical hidroxilo (OH•). O radical alcóxilo, dada a sua instabilidade, decompõe-se facilmente em vários compostos – denominados produtos secundários de oxidação – de menor massa molecular e geralmente com alta volatilidade, como aldeídos, acetonas e álcoois, responsáveis pelo odor a ranço.

Por outro lado, os radicais peróxido ou alquilo de peso molecular mais elevado, ao reagirem entre si produzem compostos não-voláteis de alto peso molecular.²

Os metais de transição funcionam como catalisadores da decomposição de hidroperóxidos que origina novos radicais livres tal e como indica as equações 7, 8 e 9.

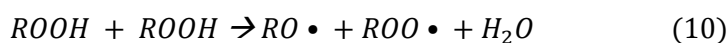
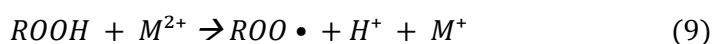
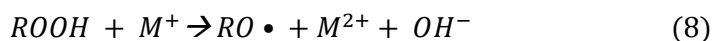


Figura. 4: Reacção de decomposição de hidroperóxidos catalisada por metais

1.1.3. Oxidação Lipídica em Emulsões

Normalmente, qualquer alimento consumido pelo ser humano é grosseiramente constituído por uma fase lipídica e uma fase aquosa, sendo a primeira, passível de deterioração por vários factores como foi apresentado no ponto 1.1.

Uma emulsão é um sistema em que dois líquidos imiscíveis se dispersam um no outro formando pequenas gotas; que normalmente são a água numa matriz de óleo (Emulsão A/O, como a manteiga) ou então gotas de óleo dispersos numa matriz aquosa (emulsão O/A, como por exemplo as sopas). Dada a instabilidade termodinâmica destas misturas binárias água-óleo, é necessário um agente emulsionante que actue na interface, para garantir a não-separação e reduzir a tensão superficial entre as duas fases, formando um produto homogéneo.

A oxidação lipídica em emulsões torna-se assim um processo mais complexo com

vários factores que afectam a sua estabilidade oxidativa, nomeadamente a pressão de O_2 , o pH, a presença de metais, bem como a presença e distribuição dos antioxidantes numa emulsão.⁶ Essa distribuição será dependente da estrutura dos antioxidantes e assim estes podem ser mais solúveis na camada aquosa ou na camada lipídica. No entanto pode existir também afinidade com a interface, onde ocorrem normalmente as reacções de oxidação. É nesta zona que a presença dos antioxidantes será de prever ser mais eficaz.

Inicialmente verificou-se que nas emulsões de óleo em água (O/A), os antioxidantes mais lipofílicos como o palmitato de ascorbilo (figura 5) apresentavam uma maior eficácia, do que em óleos, comparativamente aos antioxidantes mais hidrofílicos, como o ácido ascórbico. A esta observação denominou-se de “Paradoxo Polar”⁷.

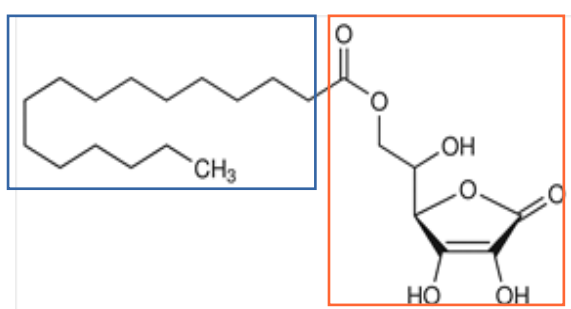


Figura 5: Estrutura química do palmitato de ascorbilo

Caixa azul: parte lipofílica da molécula

Caixa laranja: parte hidrofílica da molécula

As primeiras pesquisas à volta da influência da hidrofobicidade na actividade antioxidante em dispersões lipídicas tiveram lugar nos anos 50. Até 1955, um grande número de resultados relativos à eficácia antioxidante de compostos foi efectuado em óleos isolados e extrapolados para emulsões. No entanto, mais tarde, a comparação dos vários resultados obtidos para emulsões e óleos mostraram a existência de grandes diferenças na actividade dos mesmos antioxidantes.⁸⁻¹⁰

Porter, em 1989, baseado na atividade de 16 antioxidantes diferentes, verificou que antioxidantes mais hidrofílicos eram mais eficientes em óleos isolados e emulsões água-em-óleo (A/O), do que antioxidantes hidrofóbicos, cuja atividade antioxidante é maior em emulsões óleo-em-água, verificando-se assim o comportamento denominado então de paradoxo polar¹¹.

Em 2000, Stöckmann estudou o paradoxo polar com recurso a emulsões com óleo de milho, com diferentes emulsionantes e usando o ácido gálico e a mesma série de galatos, verificando várias ordens de eficácia de acordo com o emulsionante estudado. Nessa altura verificou que o paradoxo polar apenas se aplicava no caso de antioxidantes de cadeia curta, uma vez que verificou que o galato de octilo se desajustava do previsto pelo

paradoxo. Assim, concluiu que usando emulsionantes contendo propriedades similares aos fosfolípidos, o paradoxo polar não se verificava.¹²

Em 2009, Laguerre estudou uma série de ésteres clorogenatos em emulsões água/Brij 35/óleo de tungue e verificou um aumento da actividade antioxidante à medida que aumentava a cadeia alquílica do éster até a um patamar máximo de hidrofobicidade, denominando-o de “critical chain lenght”. Os ésteres de cadeia longa mostravam capacidade antioxidante muito próximas de zero, o que contradiz totalmente o paradoxo polar, apresentando assim um novo modelo chamado de efeito cut-off.¹³

Usando do mesmo método, confirmou em 2010 esse mesmo efeito, com recurso a uma série de ésteres do ácido rosmariníco, no qual obteve resultados ainda mais evidentes desse mesmo efeito cut-off, sendo que a partir de então este comportamento foi confirmado para outras famílias de compostos e/ou em outros sistemas.¹⁴

1.2. Antioxidantes

Um dos grandes objectivos da indústria alimentar é retardar os processos de oxidação, preservando a qualidade dos alimentos por um maior período. Esta medida torna-se vantajosa para todos, tanto para a indústria como para o consumidor que aprecia o produto em si.

Vários factores podem ser alterados de maneira a retardar ou inibir a oxidação lipídica e podem passar pela utilização de processos físicos, como por exemplo, modificar o ambiente onde se encontra o alimento, nomeadamente a embalagem (podendo esta ser em vácuo ou apenas desprovida de O_2 , isolada da luz) bem como pela utilização de processos químicos como o branqueamento enzimático.¹⁵

O método mais utilizado para evitar a oxidação da fase lipídica é a utilização de substâncias que interrompam as reacções de oxidação, sendo estas denominadas por antioxidantes. Os antioxidantes são substâncias que, em pequenas quantidades numa matriz lipídica, impedem que esta matriz se oxide.

Mediante o mecanismo de actuação, os antioxidantes podem ser classificados em dois grupos:

- Antioxidantes Primários (Chain-Breaking)
- Antioxidantes Secundários (Preventivos)

Os antioxidantes primários são antioxidantes que reagem com os radicais livres, convertendo-os em produtos mais estáveis e/ou inertes (Figura 6).

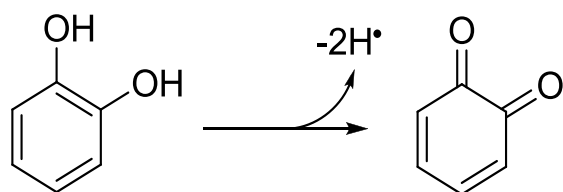


Figura 6: Reacção de transferência de hidrogénio em antioxidantes

Estes produtos são formados a partir da reacção do hidrogénio do antioxidante (AH) com os radicais $ROO\bullet$ e $RO\bullet$ formados durante a etapa de iniciação (Figura 7).

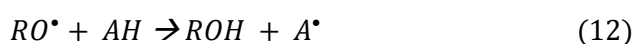
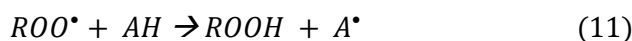


Figura 7: Reacção de radicais com os antioxidantes (transferência de hidrogénio)

Os fenóis e seus derivados são um exemplo deste tipo de antioxidantes. O fenol por si só não é antioxidante, mas a presença de grupos substituintes alquila no C2 ou C6 com grande volume provocam um impedimento estérico no anel, diminuindo assim a reactividade do radical fenoxilo.

No caso de estruturas catecólicas, a transferência de hidrogénio leva a formação de quinonas, moléculas muito estáveis

A eficácia dos antioxidantes que contem grupos fenólicos depende significativamente da sua estrutura, tendo sido verificada uma maior eficácia para compostos com grupos galiol relativamente a compostos com estrutura catecólica, dada a maior estabilidade do radical formado, em que o electrão se encontra estabilizado por 3 grupos OH.¹⁶

Os antioxidantes secundários reduzem a velocidade do processo de iniciação da oxidação, impedindo a formação de radicais livres (R') através de métodos indirectos, como por exemplo, por complexação de metais ou absorção de radiação UV.

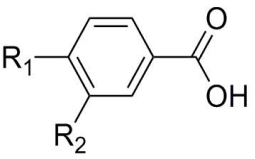
A maior parte dos antioxidantes usados são normalmente compostos naturais de origem fenólica, como os tocoferóis, ou compostos sintéticos como por exemplo, 2,6-diterc-butil-metilfenol (BHT) ou o 2 e o 3-terc-butil-4-hidroxianisol (BHA). Estes últimos apresentam grande eficiência antioxidante, no entanto, alguns estudos revelam que estes são possivelmente carcinogénicos, levando à sua rejeição.¹⁷

1.2.1. Ácidos fenólicos – ácido protocatecuico

Os ácidos fenólicos são ácidos carboxílicos aromáticos que possuem pelo menos um grupo OH no anel aromático. Alguns derivados metoxilados, embora sem nenhum grupo hidroxilo no anel aromático, são considerados muitas vezes como pertencentes a este grupo, como por exemplo o ácido vanílico e o ácido sirínico. Dependendo dos substituintes no anel aromático e da posição dos grupos OH, estes têm poder antioxidante diferente.

Existem vários tipos de ácidos fenólicos, representando-se alguns na Tabela 1.¹⁸

Tabela 1: Estrutura de ácidos fenólicos e seu nome trivial

Estrutura Geral	R ₁	R ₂	Ácido Fenólico
	OH	H	Ácido p-hidroxibenzóico
	OH	OH	Ácido Protocatecuico
	H	OCH ₃	Ácido Vanílico
	OCH ₃	OCH ₃	Ácido Sirínico

Como referido anteriormente, os ácidos fenólicos para além da actividade antioxidante demonstrada em matrizes lipídicas, têm também interesse biológico, já que possuem efeitos antialérgicos, antimicóticos, entre outros.

No entanto, em sistemas emulsionados, devido a sua grande solubilidade em água, estes estão dissolvidos preferencialmente na fase aquosa, dando pouca ou nenhuma protecção à fase oleosa. Assim, é necessário proceder-se à manipulação do composto adicionando-lhe uma cadeia alquílica de modo a que este seja mais lipossolúvel.

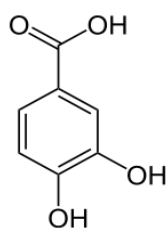


Figura 8: Estrutura química do ácido protocatecuico

No caso concreto deste presente trabalho utilizou-se como composto base para efectuar estas modificações o ácido protocatecuico (ácido 3,4-dihidroxibenzóico), ácido derivado do ácido benzóico, possuindo dois grupos OH nas posições 3 e 4, como mostra a Figura 8.

Este ácido tem presentes dois grupos importantes na sua constituição:

- O grupo catecol, importante na actividade antioxidante, através da doação de hidrogénio e consequentemente formação de quinonas.
- O grupo carboxilo, que será o ponto onde se modificará a lipossolubilidade da molécula, convertendo o ácido carboxílico num respectivo éster mais apolar.

1.2.2.Obtenção de derivados lipofílicos do ácido protocatecuico por esterificação

Os derivados mais lipofílicos do ácido protocatecuico podem ser obtidos por esterificação do grupo carbonilo. A esterificação é uma reacção química reversível, resultante da reacção de um ácido carboxílico e de um álcool, normalmente catalisada por ácidos. Dado estas reacções de esterificação terem uma constante de equilíbrio baixa, o rendimento da reacção é normalmente baixo.¹⁹

Assim, de modo a aumentar o rendimento da esterificação, podem ser utilizados derivados dos ácidos carboxílicos como os halogenetos de acilo. No entanto existe o

inconveniente de não existirem comercialmente halogenetos de acilo de todos os ácidos carboxílicos, tendo estes que ser preparados.

O uso de anidridos de ácido é uma outra alternativa aos correspondentes ácidos carboxílicos. Os anidridos de ácido são muito mais reactivos, em comparação aos ácidos carboxílicos correspondentes, facilitando assim a reacção de esterificação, tendo também a vantagem de, quando em excesso, formam ácidos carboxílicos, numa reacção paralela com a água resultante da reacção de esterificação. No entanto estes também tem de ser preparados dada a inexistência comercial dos mesmos.

1.2.2.1. Esterificação com álcoois alifáticos com catalisadores ácidos¹⁹

A esterificação com catalisador ácido é uma técnica muito utilizada, pois é bastante simples e consiste na reacção de um ácido, neste caso o ácido protocatecuico, com um álcool na presença de um ácido forte.

Esta reacção inicia-se pela protonação do carbonilo, formando um intermediário estabilizado por ressonância (Figura 9).

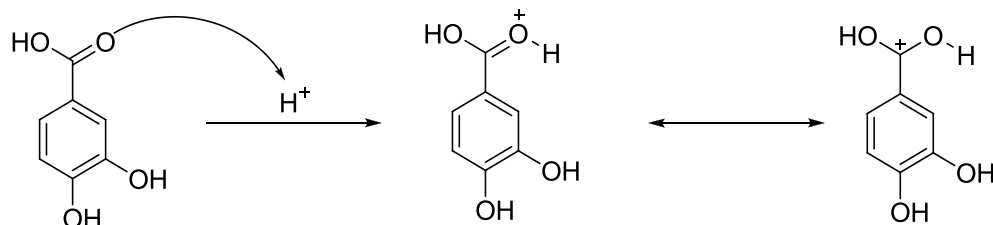


Figura 9: Protonação do grupo carbonilo

O álcool ataca no carbono carbonílico, com a formação de um intermediário tetraédrico (Figura 10).

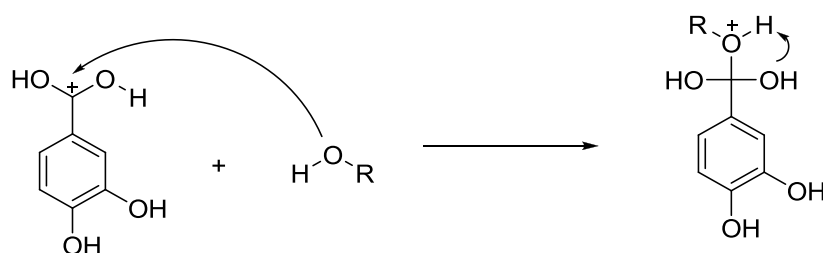


Figura 10: Formação de derivados tetraédricos de transição

Ocorre protonação de um dos grupos hidroxilo que abandona a molécula sob a

forma de H_2O (Figura 11).

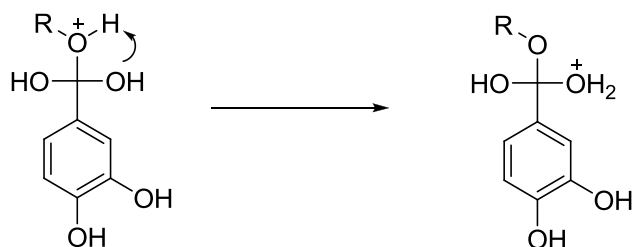


Figura 11: Formação do grupo O-R e consequente formação do grupo de saída H_2O

A perda do grupo H_2O e do catião H^+ do grupo OH restante leva a formação do éster e regeneração do catalisador (Figura 12).

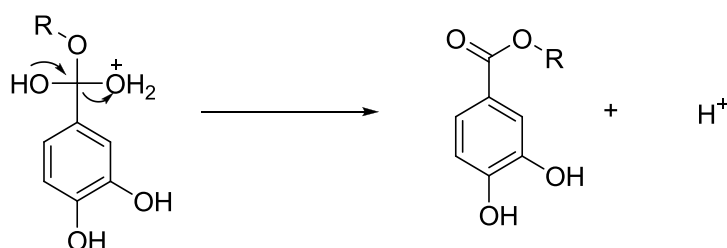


Figura 12: Obtenção de ésteres protocatecuatos com regeneração do catalisador

1.2.2.2. Esterificação com alcoóis alifáticos com catalisador enzimático²⁰

As lipases são enzimas de elevada estabilidade, com actividade mesmo em condições mais adversas. Estas enzimas são extraídas de animais e plantas bem como microorganismos modificados utilizados para esse fim e são aplicadas na indústria farmacêutica ou mesmo nos processos industriais de obtenção de biodiesel. As reacções de esterificação catalisadas por lipases estão entre os processos químicos mais relevantes na indústria, dado o uso crescente de ésteres orgânicos para os mais variados fins.

Actualmente estão a ser desenvolvidos métodos de optimização das enzimas e da reacção de esterificação; pela remoção das moléculas de água produzidas durante a reacção de modo a evitar a hidrólise dos ésteres sintetizados. De facto, as enzimas do tipo hidrolíticas como as lipases necessitam de água para serem funcionais e catalisarem a reacção de hidrólise. No entanto, na ausência de água no meio reaccional, a enzima catalisa a reacção contrária. Assim, a reacção deverá ser efectuada de modo a minimizar a presença de água, tendo em atenção a pureza e hidratação dos reagentes, a pressão de vapor de água existente no ar ou a estrutura dos substratos, de difícil acesso ao centro activo da enzima.

1.3. Avaliação da capacidade antiradicalar – Método de DPPH•²¹

A avaliação da actividade antiradicalar de um composto exprime a eficácia de uma substância captar radicais. O método utilizado neste trabalho recorreu ao radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH•), que é reduzido a difenil-picril-hidrazina pelos antioxidantes, havendo uma mudança de cor de púrpura forte para amarelo, respectivamente (Figura 13).

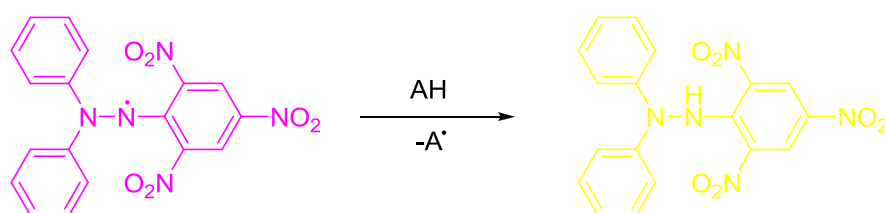


Figura 13: Reacção de Redução do radical DPPH• na presença de um antioxidante (AH)

Este método baseia-se na monitorização do consumo de DPPH• por reacção com um antioxidante, através da medida a $\lambda = 515$ nm, da diminuição da absorvância de soluções metanólicas de DPPH• na presença de diferentes concentrações de AO, figura 14.

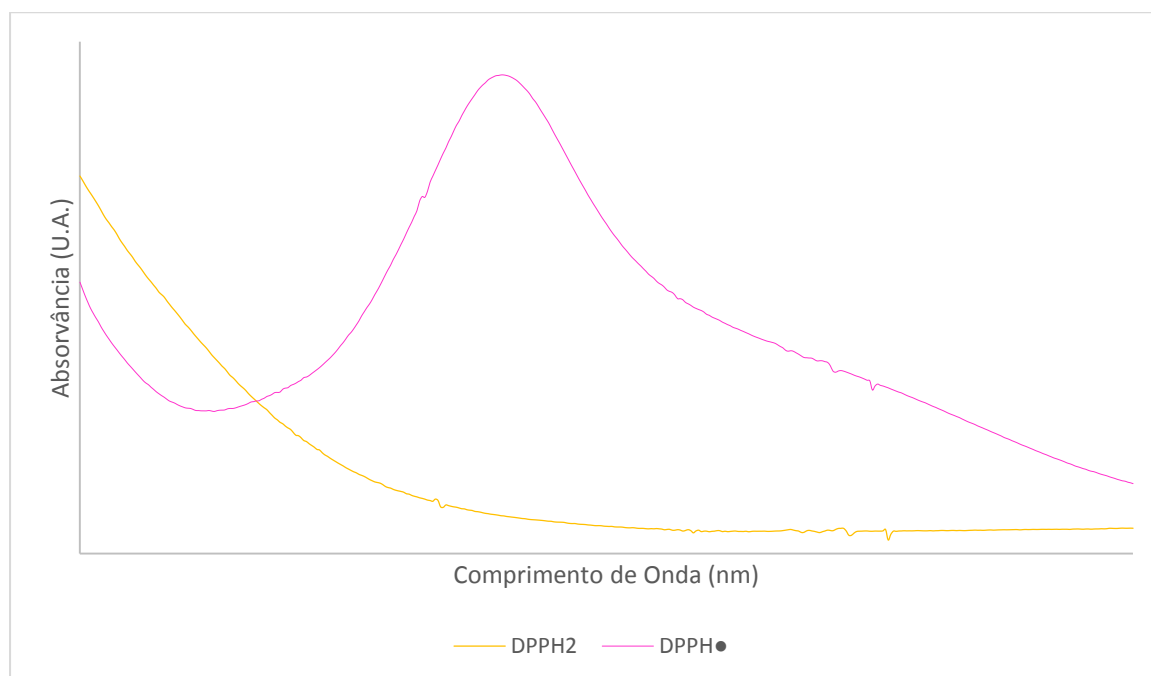


Figura 14: Espectros de Absorção UV-Visível da monitorização do método de DPPH• e da sua reacção com um antioxidante.

A partir dos resultados obtidos, consegue-se determinar o parâmetro EC_{50} , a quantidade de antioxidante necessária para diminuir a quantidade de radicais de DPPH•

iniciais para metade.²¹

Os antioxidantes podem actuar por dois mecanismos: por transferência electrónica (TE) ou por transferência de átomos de hidrogénio (TAH). São reacções com parâmetros cinéticos diferentes, seguindo passos intermediários diferentes, mas que tem os mesmos produtos finais.²²

Nos mecanismos baseados em TAH, ocorre a doação de um átomo de hidrogénio do antioxidante para o radical. Esta reacção é de carácter cinético, independente de pH e solvente, sendo normalmente lenta. Nos mecanismos baseados em TE, a capacidade antiradicalar é avaliada pela capacidade de doação de electrões, e deste modo reduzir qualquer composto, seja este um radical ou qualquer ião metálico presente no meio. Este tipo de reacções é de cinética rápida e dependente do pH, e ocorre preferencialmente em solventes polares.²²

A estrutura química do antioxidante e o solvente são factores que determinam o mecanismo reaccional, e, atendendo às condições em que o método de DPPH• foi utilizado, maioritariamente este segue um mecanismo de transferência electrónica, dado ser um solvente polar (metanol).

Para além do uso de soluções rigorosas, dado ser um método quantitativo, o controlo da temperatura também deve ser bem definido, dada a temperatura poder também influenciar os resultados experimentais.

1.4. Avaliação da actividade antioxidante – Teste de Estufa de Schaal

A reacção de oxidação em lípidos é uma reacção química que, como qualquer uma, depende da temperatura. A estabilidade dos óleos e gorduras pode ser avaliado mediante a exposição dos mesmos a temperaturas bem definidas. Essas avaliações são realizadas ao longo do tempo, do qual se pode traçar um perfil entre o comportamento do óleo e o tempo de exposição.¹

Sendo este teste dependente da temperatura em questão, e sendo a temperatura uma condicionante da velocidade reaccional, denominam-se estes testes de testes acelerados.

O teste de Estufa de Schaal é um dos métodos de oxidação mais utilizados para traçar esse mesmo perfil de oxidação lipídica. É um teste baseado em reacções de transferência de átomos de hidrogénio (TAH), onde as amostras de óleo/gordura são submetidas a uma temperatura definida, em todo o teste, na presença dos vários antioxidantes.

O seu estado de oxidação, na presença dos vários antioxidantes, é analisado mediante a avaliação em produtos de oxidação (dienos e trienos conjugados, análise sensorial, índice de peróxidos) ao longo do tempo em que é levado o teste a cabo.²³

É um teste originalmente aplicado a óleos e gorduras, no entanto, tem sido estudado o seu efeito em emulsões, tendo-se obtido bons resultados, ou seja, torna-se possível a aplicação do mesmo em sistemas emulsionados.²⁴

Comparando estes testes com testes realizados em condições normais de armazenamento, consegue-se uma boa correlação entre eles, e a partir dos mesmos, é possível estimar um tempo de prateleira para os óleos/alimentos/emulsões em questão.

1.5. Distribuição de Antioxidantes

1.5.1. Determinação das constantes de partição dos antioxidantes em sistemas binários²⁵

A distribuição de qualquer substância entre duas fases imiscíveis, óleo de soja e água, tem critérios a seguir, definidos pela afinidade do composto nos dois meios. Assim, a presença de cadeias alifáticas hidrofóbicas e grupos aromáticos não substituídos tem afinidade por fases apolares, dadas as forças de London e Van der Waals. Já a presença de grupos funcionais polares permite que estes grupos se liguem a fases polares, através de interações como pontes de hidrogénio ou ligações iónicas.

Sendo assim, e dado os antioxidantes sintetizados e estudados serem substâncias anfífilas, onde a cadeia alquílica introduzida pelas reacções de esterificação irá aumentar a sua solubilidade na fase orgânica, a distribuição deste numa mistura binária óleo de soja-água terá de ser avaliada por um rácio entre a concentração de antioxidante presente na fase orgânica e a concentração de antioxidante na fase aquosa (Figura 15). Assim, a distribuição de um antioxidante entre duas fases imiscíveis óleo de soja e água vai a ser definida por uma constante de partição P_A^O (cociente adimensional das concentrações de antioxidante em cada fase).

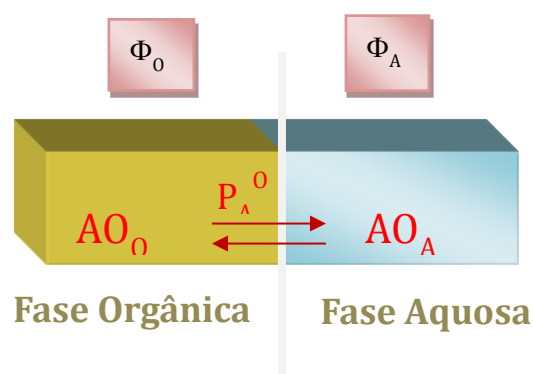


Figura. 15: Esquema da distribuição de um antioxidante (AO) num a mistura binária O/A

A constante de partição será tão mais alta quanto a concentração de antioxidante na fase oleosa. Por outro lado, quando há uma diminuição da constante de partição, aumenta a concentração de antioxidante na fase aquosa.

1.5.2.Determinação das constantes de partição dos antioxidantes em sistemas emulsionados

A avaliação da distribuição de um composto em dois meios imiscíveis consegue ser na prática fácil de realizar, dado que as interações entre os dois meios estabelecem uma certa repulsão e o isolamento dos mesmos torna-se fácil e seguro, não havendo contaminação de um meio entre o outro que não seja visível a olho nu.

No entanto, a partir do momento em que o mesmo é realizado em emulsões, existe o problema da presença da interface, que não pode ser separada das outras regiões (oleosa e aquosa), sendo impossível de determinar a concentração de antioxidante presente na mesma a partir do método descrito para misturas contendo apenas dois meios imiscíveis.^{12,26}

Não existindo um método aceite para quantificar a presença de antioxidante na interface a partir de um simples isolamento, Sanchez²⁷ et al desenvolveram um método cinético para quantificar a presença de antioxidante entre as várias fases (óleo, água e a interface) utilizando a reacção do antioxidante com o catião hexadecilarenodiazónio (16-Ar-N_2^+) catião este que devido à presença na sua estrutura de uma cadeia alquílica longa, o torna hidrofóbico e lipofóbico ao mesmo tempo, garantindo assim que este catião apenas possa reagir na interface da emulsão. Assim, este método cinético permite que a análise seja feita na própria emulsão, e baseia-se no modelo cinético da pseudofase.

1.5.2.1. Modelo cinético de Pseudofase extendido a emulsões

O modelo cinético de pseudofase foi originalmente criado para avaliação da distribuição de compostos em micelas, e pressupõe a existência de duas fases distintas, em equilíbrio entre si: a fase aquosa e a fase micelar.²⁸⁻³¹

Tendo em conta que o comportamento de um antioxidante em sistemas emulsionados ocorre como nas micelas, este método pode ser aplicado também a emulsões.

Uma emulsão, no seu modo mais simples, é constituída por uma fase aquosa, uma fase oleosa e uma interface (Figura 16).

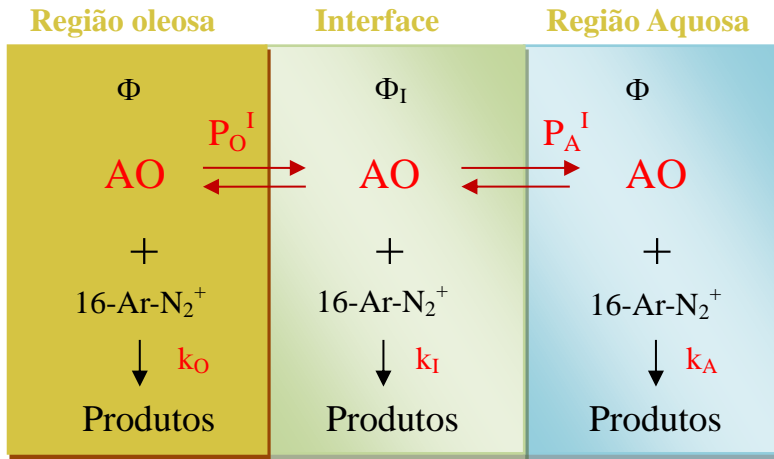


Figura 16: Representação esquemática de uma emulsão, enunciando todas as interações entre fases

A região interfásica é muito pequena, comparada com as outras duas, muitas vezes assumindo um espessura na ordem de 10^{-9} m (1 nm); formada essencialmente por emulsionante, água e óleo. Dada a sua constituição e a necessidade do emulsionante fazer a ligação entre as duas fases imiscíveis, esta região é altamente anisotrópica e, consequentemente, impossível de isolar e quantificar por métodos tradicionais.

No entanto, para se definir a distribuição de um antioxidante numa emulsão composta pelas regiões interfásica, aquosa e oleosa, requerem-se duas constantes de partição: a correspondente às regiões oleosa e interfásica, P_O^I , e outra entre as regiões aquosa e interfásica, P_A^I , em que.

$$P_O^I = \frac{(AO)_I}{(AO)_O} \quad (13)$$

$$P_A^I = \frac{(AO)_I}{(AO)_A} \quad (14)$$

sendo, $(AO)_I$, $(AO)_O$ e $(AO)_A$, as concentrações de antioxidante, expressas em mol/L, nas regiões interfásica, oleosa e aquosa, respectivamente.

Considerando que todo o emulsionante se encontra na interface, os volumes de água, óleo e emulsionante correspondem ao volume de fase aquosa, oleosa e interface^{32,33}. Assim, é possível quantificar as várias fases da emulsão pelas suas fracções volúmicas, ϕ_A , ϕ_O e ϕ_I , dado que:

$$\phi_A = \frac{V_A}{V_A + V_O + V_I} \quad (15)$$

$$\phi_O = \frac{V_O}{V_A + V_O + V_I} \quad (16)$$

$$\phi_I = \frac{V_I}{V_A + V_O + V_I} \quad (17)$$

Com base no modelo cinético de pseudofase, aplicado a este contexto, a reacção entre os antioxidantes e os catiões 16ArN_2^+ expressa-se pela equação global,

$$v = k \cdot |16\text{ArN}_2^+| \cdot |\text{AO}| \quad (18)$$

sendo k a constante de velocidade, $|16\text{-Ar-N}_2^+|$ a concentração dos iões 16ArN_2^+ na emulsão, expressa em mol/L e $|\text{AO}|$ a concentração de antioxidante na emulsão, expressa em mol/L.

Como a reacção ocorre dinamicamente entre as 3 regiões (Figura 16), a velocidade desta pode ser calculada, sabendo a velocidade de reacção em cada uma das fases, ou seja,

$$v = k_O \cdot (16\text{ArN}_2^+)_O \cdot (\text{AO})_O \cdot \phi_O + k_A \cdot (16\text{ArN}_2^+)_A \cdot (\text{AO})_A \cdot \phi_A + k_I \cdot (16\text{ArN}_2^+)_I \cdot (\text{AO})_I \cdot \phi_I \quad (19)$$

sendo k a constante de velocidade, $(16\text{-Ar-N}_2^+)_x$ a concentração dos iões 16ArN_2^+ , expressa em mol/L, $(\text{AO})_x$ a concentração de antioxidante, expressa em mol/L, ϕ a fracção volúmica da fase em questão e as letras subscritas O, A e I, as regiões oleosa, aquosa e interface, respectivamente.

Tendo em conta que sonda química, tetrafluorato de hexadecilarenodiazónio, $16\text{ArN}_2^+\text{BF}_4^-$, é um sal cuja presença de uma cadeia alquílica longa na sua estrutura o torna insolúvel em água, e a presença do grupo arenodiazónio o torna insolúvel em óleo, a sua concentração nas fases aquosa e oleosa será desprezável, localizando-se apenas na interface (Figura 17).

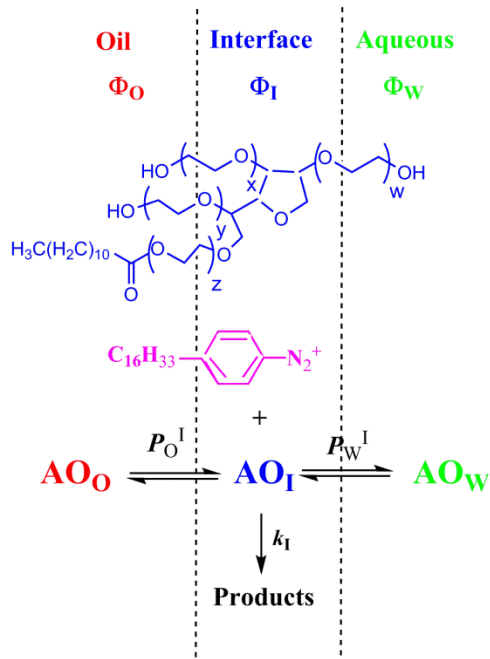


Figura 17: Representação esquemática de uma emulsão, e da reacção de 16-Ar-N₂⁺ com o AO presente na interface

Assim, assume-se que a velocidade de reacção global será igual à velocidade da reacção na interface, isto é:

$$v = k \cdot |16ArN_2^+| \cdot |AO| = k_I \cdot (16ArN_2^+)_I \cdot (AO)_I \cdot \phi_I \quad (20)$$

sendo

$$|16ArN_2^+| = \phi_I \cdot (16ArN_2^+)_I \quad (21)$$

Uma vez utilizando condições de pseudo-primeira ordem, em que $|AO| \gg \gg |16ArN_2^+|$, a concentração de antioxidante não irá variar significativamente pelo que a constante de velocidade k_{obs} será a velocidade obtida experimentalmente, ou seja;

$$v = k \cdot |16ArN_2^+| \cdot |AO| \leftrightarrow \frac{v}{|16ArN_2^+|} = k_{obs} = k \cdot |AO| \quad (22)$$

Atendendo a que

$$|AO| = (AO)_O \cdot \phi_O + (AO)_A \cdot \phi_A + (AO)_I \cdot \phi_I \quad (23)$$

e que

$$\frac{P_O^I}{P_A^I} = \frac{\frac{(AO)_I}{(AO)_O}}{\frac{(AO)_I}{(AO)_A}} \quad (24)$$

combinando estas expressões teremos:

$$(AO)_I = |AO| \cdot \frac{P_O^I P_A^I}{\phi_O P_A^I + \phi_I P_A^I P_O^I + \phi_A P_O^I} \quad (25)$$

e deste modo;

$$k_{obs} = k \cdot |AO| = k_I \cdot (AO)_I = k_I |AO| \frac{P_O^I P_A^I}{\phi_O P_A^I + \phi_A P_O^I + P_O^I P_A^I \phi_I} \quad (26)$$

Considerando os termos:

$$b = \frac{P_A^I P_O^I (1 + \frac{\phi_A}{\phi_O})}{P_A^I + \frac{\phi_A P_O^I}{\phi_O}} - 1 \quad (27)$$

$$a = \frac{|AO| k_I P_A^I P_O^I (1 + \frac{\phi_A}{\phi_O})}{P_A^I + \frac{\phi_A P_O^I}{\phi_O}} \quad (28)$$

pode simplificar-se a expressão 14 como sendo

$$k_{obs} = \frac{a}{b\phi_I + 1} \leftrightarrow \frac{1}{k} = \frac{1}{a} + \frac{b}{a} \phi_I \quad (29)$$

A partir da relação linear entre $1/k_{obs}$ e ϕ_I obtem-se os valores de ordenada de origem ($1/a$) e declive (b/a), e assim, os valores dos parâmetros a e b .

Ademais, considera-se que:

- A distribuição de todos os componentes estão em equilíbrio dinâmico, isto é, a constante de velocidade observada para a reacção entre o antioxidante e os iões 16-ArN_2^+ não é limitada pelas suas velocidades de transporte entre as regiões oleosa, aquosa e interfacial;
- A partição do antioxidante entre as regiões oleosa, aquosa e interfacial depende apenas da sua solubilidade relativa em cada uma das regiões e não do tamanho ou da forma das gotículas de fase dispersa na emulsão

bem como do facto de se tratar de uma emulsão O/A ou A/O.

Para se obterem os valores de P_O^I e de P_A^I são necessários:

- $k_{\text{obs}} = f(\Phi_I)$ (fracção de volume da região interfacial)
- o valor da constante de partição num sistema binário, P_A^O (o quociente das constantes de partição P_A^I e P_O^I representa o valor de P_A^O), em que:

$$P_A^O = \frac{P_O^I}{P_A^I} = \frac{(AO_O)}{(AO_A)} \quad (30)$$

Após a determinação de P_O^I e P_A^I , a partir do valor do parâmetro a determina-se a constante de velocidade k_I .

Também é possível a determinação de P_O^I e P_A^I sem utilizar o valor de P_A^O . Esta determinação é estabelecida utilizando dois valores de b obtidos para emulsões com diferente proporção O/A, ou seja, alterando os valores de ϕ_O e ϕ_A e resolvendo um sistema de equações com duas incógnitas;

$$\begin{cases} b_1 = \frac{P_A^I P_O^I (1 + \frac{\phi_{A1}}{\phi_{O1}})}{P_A^I + \frac{\phi_{A1}}{\phi_{O1}} P_O^I} - 1 \\ b_2 = \frac{P_A^I P_O^I (1 + \frac{\phi_{A2}}{\phi_{O2}})}{P_A^I + \frac{\phi_{A2}}{\phi_{O2}} P_O^I} - 1 \end{cases} \quad (31)$$

Obtendo P_A^I e P_O^I , pode-se então determinar a percentagem de antioxidante presente em cada uma das regiões, %AO_A, %AO_O e %AO_I, na região aquosa, oleosa e interfásica, respectivamente, em que,

$$\%AO_A = \frac{100\phi_A P_O^I}{\phi_O P_A^I + \phi_A P_O^I + P_O^I P_A^I \phi_I} \quad (32)$$

$$\%AO_O = \frac{100\phi_O P_A^I}{\phi_O P_A^I + \phi_A P_O^I + P_O^I P_A^I \phi_I} \quad (33)$$

$$\%AO_I = \frac{100\phi_I P_O^I P_A^I}{\phi_O P_A^I + \phi_A P_O^I + P_O^I P_A^I \phi_I} \quad (34)$$

1.5.2.2. Simplificação do modelo cinético de pseudofase.

Quando um antioxidante se encontra principalmente numa das regiões da emulsão, e conseqüentemente, a concentração na outra fase é mínima, determinar as constantes de partição pode gerar grandes erros, já que uma das constantes de partição é muito maior que a outra. Neste caso, o modelo cinético de pseudofase pode ser simplificado na medida que, sendo a concentração de antioxidante numa das regiões praticamente nula, apenas é necessário determinar uma das constantes de partição.

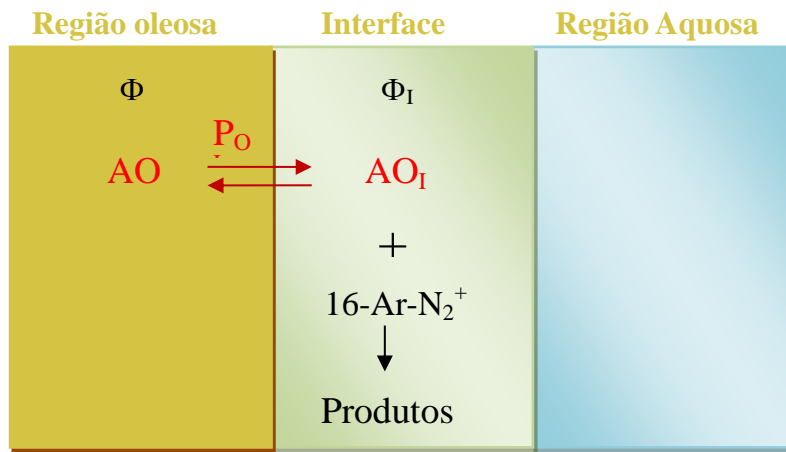


Figura 18: Representação esquemática de uma emulsão com um antioxidante lipofílico e sua reação com 16-Ar-N_2^+

Assim supondo que a distribuição tem lugar principalmente entre as regiões oleosa e interface (sendo assim a solubilidade do antioxidante nula na região aquosa), a concentração total de antioxidante pode ser dada por:

$$[AO] = (AO)_I \phi_I + (AO)_O \phi_O \quad (35)$$

Deste modo, substitui-se na equação anterior a definição de P_O^I , obtendo-se, assim,

$$(AO)_I = [AO] \frac{P_O^I}{\phi_O + \phi_I P_O^I} \quad (36)$$

Assim, a relação entre $k_{obs} = f([AO])$ é dada pela expressão,

$$k_{obs} = [AO] k_I \frac{P_O^I}{\phi_O + \phi_I P_O^I} = [AO] k_I \frac{\frac{P_O^I}{\phi_O}}{1 + \phi_I \frac{P_O^I}{\phi_O}} \quad (37)$$

Esta representação pode ser representada por

$$k_{obs} = \frac{ab}{b\phi_I + 1} \quad (38)$$

ou então pela sua inversa,

$$\frac{1}{k_{obs}} = \frac{1}{ab} + \frac{1}{a} \phi_I \quad (39)$$

Assim, consegue-se determinar os parâmetros a e b , em que

$$a = |AO|k_I \quad (40)$$

$$b = \frac{P_O^I}{\phi_O} \quad (41)$$

A partir destas equações calculam-se os valores de P_O^I e k_I , que por sua vez, permitirá quantificar %AO_O e %AO_I, em que:

$$\%AO_O = \frac{100\phi_O}{\phi_O + P_O^I\phi_I} \quad (42)$$

$$\%AO_I = \frac{100\phi_I P_O^I}{\phi_O + P_O^I\phi_I} \quad (43)$$

No caso em que a distribuição tem lugar principalmente entre as regiões aquosa e interface, a solubilidade do antioxidante será nula na região oleosa (Figura 19), e deste modo a concentração total de antioxidante pode ser quantificada por:

$$|AO| = (AO)_I\phi_I + (AO)_A\phi_A \quad (44)$$

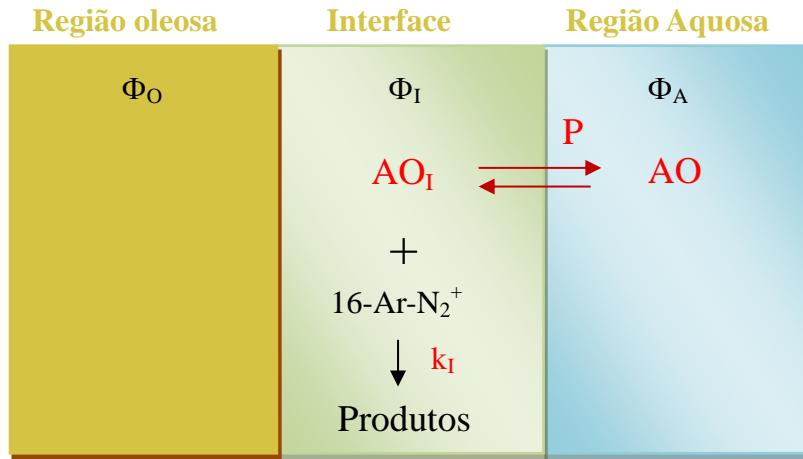


Figura 19: Representação esquemática de uma emulsão com um antioxidante hidrofílico e sua reação com 16-Ar-N_2^+

Procedendo do mesmo modo que para o caso anterior (antioxidantes hidrofóbicos),

$$(AO)_I = |AO| \frac{P_A^I}{\phi_A + \phi_I P_A^I} \quad (45)$$

sendo a relação entre $k_{obs} = f(|AO|)$ obtida pela expressão

$$k_{obs} = |AO| k_I \frac{P_A^I}{\phi_A + \phi_I P_A^I} = |AO| k_I \frac{\frac{P_A^I}{\phi_A}}{1 + \phi_I \frac{P_A^I}{\phi_A}} \quad (46)$$

Como tal, podemos representa-la igualmente por

$$k_{obs} = \frac{ab}{b\phi_I + 1} \quad (47)$$

ou pela sua inversa;

$$\frac{1}{k_{obs}} = \frac{1}{ab} + \frac{1}{a} \phi_I \quad (48)$$

Assim é possível determinar os parâmetros a e b, em que:

$$a = |AO| k_I \quad (49)$$

$$b = \frac{P_A^I}{\phi_A} \quad (50)$$

A partir destas equações determina-se os valores de P_A^I e k_I , que por sua vez, serão usados para quantificar %AO_O e %AO_I, em que:

$$\%AO_A = \frac{100\phi_A}{\phi_A + P_A^I \phi_I} \quad (51)$$

$$\%AO_I = \frac{100\phi_I P_A^I}{\phi_A + P_A^I \phi_I} \quad (52)$$

2. OBJETIVO

Este trabalho está inserido num projecto que pretende estudar a influência da localização dos antioxidantes na sua actividade antioxidante em emulsões. Para isso procedeu-se à síntese de fenolípidos derivados do ácido protocatecuico e estudou-se a sua distribuição em misturas binárias água:óleo de soja, e em emulsões água/tween 20/óleo de soja, bem como a sua capacidade antiradicalar e atividade antioxidante nas mesmas emulsões água/tween 20/óleo de soja.

Os principais objetivos estabelecidos durante o desenvolvimento desta dissertação foram os seguintes:

- Estudar a distribuição dos ésteres alquílicos do ácido protocatecuico sintetizados (Figura 20) em emulsões de óleo de soja mediante a utilização de um método cinético baseado no modelo cinético de pseudofase.
- Estudar a eficácia antioxidante dos antioxidantes sintetizados nas mesmas emulsões descritas no ponto anterior.
- Correlacionar a distribuição dos vários antioxidantes com a sua eficácia antioxidante.

Uma das principais causas da deterioração dos alimentos (principalmente ricos em ácidos gordos insaturados, PUFA's) é a oxidação lipídica. Por este motivo é de vital importância para a indústria alimentar e não-alimentar (farmacêutica,...) descobrir novas estratégias que permitam inibir a oxidação lipídica com a finalidade de manter a qualidade nutricional e organoléptica dos produtos alimentares e não-alimentares com base lipídica.

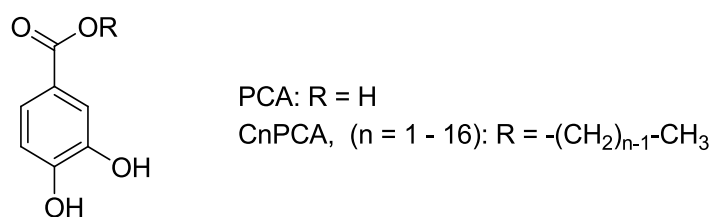


Figura 20: Estrutura química do ácido protocatecuico e dos seus derivados

3. METODOLOGIA E PROCEDIMENTOS

3.1. Métodos e reagentes de síntese

Para a síntese dos ésteres protocatecuatos, utilizaram-se algumas técnicas para avaliar o decorrer das reacções, como a cromatografia de camada fina (TLC) e determinar a identidade e pureza dos compostos como as ressonâncias magnéticas nucleares de protão (^1H -RMN) e de carbono (^{13}C -RMN) e espectroscopia de ionização de massa electrospray (ESI-MS).

Para a purificação dos compostos em questão recorreu-se a cromatografia em coluna, utilizando como fase estacionária gel de sílica (0,040-0,063 mm, Merck) e como eluente $\text{CHCl}_3\text{:MeOH}$ (98:2, v/v)

Usaram-se placas de TLC de gel de sílica em suporte de alumínio (Merck 60 S_{254}), tendo estas sido reveladas de três modos:

- UV/Vis (254 nm)
- Câmara de Iodo
- Solução de Mostain (100 mL H_2SO_4 10%, 5,0 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 22,0 g $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$)

Os espectros de ressonância magnética nuclear (^1H e ^{13}C) foram traçados num espectrofotómetro Bruker Avance III 400, usando, como solvente, acetona deuterada.

As análises de ESI-MS foram realizadas num espectrómetro de massa Finnigan LCQ DECA XP MAX equipado com uma fonte API, com recurso a uma sonda de ionização de electrospray (ESI), com um fluxo de bomba de 3 $\mu\text{L}/\text{min}$. A temperatura do capilar foi de 180°C e a voltagem foi de 3V, tendo-se obtido os espectros em modo de iões negativos.

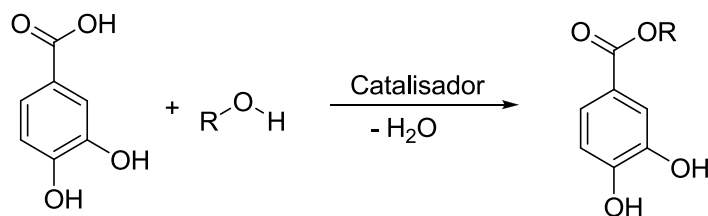
Para o método de DPPH•, utilizou-se um contador de placas UV/Vis PowerWave XS da Bio-Tek, usando como suporte placas de poliestireno 8x12 poços.

Para o teste de estufa de Schaal foi utilizado um orbital Incubator Heidolph 1000 Orbital Stirrer equipado com um Heidolph Thermostat 1010.

Todos os solventes utilizados foram de qualidade “Para Análise” das marcas Merck, Sigma Aldrich ou Fluka.

3.2. Síntese de Protocatecuatos

Sintetizaram-se vários ésteres do ácido protocatecuico a partir da reacção deste com alcoóis, por vários métodos, a fim de obter os compostos desejados.



CnPCA, (n = 1 - 16): R = -(CH₂)_{n-1}-CH₃

Figura 21: Reacção de esterificação do ácido protocatecuico

Todos as sínteses foram seguidas com recurso a cromatografia em camada fina, usando como eluente as misturas AcOEt/Éter de Petróleo 1:1 (v/v) e CHCl₃:MeOH 98:2 (v/v).

3.2.1. Obtenção dos protocatecuatos de cadeia curta³⁴

Para um balão de fundo redondo de 100 mL transferiu-se 1g de ácido protocatecuico, 75 mL de álcool e 2 mL H_2SO_4 concentrado, ficando a reacção a decorrer a temperatura ambiente, em refluxo, durante 5 dias.

Após 5 dias de reacção, neutralizou-se a mistura reaccional com NaHCO_3 1M (pH 7).

Extraiu-se a camada orgânica com 3 porções de 150 mL de éter etílico, secou-se a camada orgânica com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), filtrou-se e evaporou-se o solvente.

No caso dos derivados C3PCA e C4PCA, uma vez que não foi possível retirar todo o solvente, procedeu-se à cristalização com hexano.

Identificaram-se os compostos por RMN (^1H e ^{13}C) e ESI-MS.

3.2.2. Obtenção dos protocatecuatos de cadeia longa

Para um balão de fundo redondo de 100 mL transferiram-se 6,49 mmoles de PCA, 6,49 mmoles de álcool, 10 mL de benzeno e 0.051 g de ácido p-toluenossulfônico.

Deixa-se a reação em refluxo durante os dias indicados na tabela 2 a uma temperatura de 80°C.

Tabela 2: Número de dias de reação de cada composto sintetizado por catalisador H1

Antioxidante	tempo/dias
C6PCA	1
C8PCA	2
C10PCA	2
C12PCA	1
C14PCA	1
C16PCA	6

Posteriormente adicionaram-se 30 mL de éter etílico e extraiu-se a camada orgânica através de 8 porções de 30 mL NaHCO₃ 0,6 M.

Secou-se a camada orgânica com sulfato de sódio anidro, flitrou-se e evaporou-se o solvente.

Purificou-se por cromatografia em coluna utilizando como eluente CHCl₃:MeOH 98:2 (v/v).

Identificaram-se os compostos por RMN (¹H e ¹³C) e ESI-MS.

3.3. Remoção dos antioxidantes dos óleos alimentares usados na preparação das emulsões

De modo a ser possível avaliar a capacidade antioxidante dos compostos sintetizados em emulsões O/A, foi necessário obter uma fase oleosa isenta dos seus antioxidantes naturais.

Para a remoção dos tocoferóis do óleo de soja, seguiu-se o procedimento descrito por Yoshida³⁵ com algumas modificações. Desta forma preparou-se uma coluna cromatográfica contendo como fase estacionária alumina ativada. Para isso, para cada coluna efetuada, ativaram-se 300 gramas de alumina (óxido de alumina 90 ativo neutro Merck 0.063-0.200 nm) com água desionizada e posterior secagem numa mufla a 200°C durante 48 horas.

Passou-se o óleo por esta coluna e armazenou-se, livre de tocoferóis, a -20°C.

3.3.1. Obtenção dos ésteres metílicos dos ácidos gordos e sua análise por cromatografia gasosa

Pesaram-se entre 150-200 mg de cada óleo analisado (óleo de soja, óleo de milho e azeite), ou de cada um dos padrões utilizados para um tubo de hidrólise e adicionaram-se 2 mL de $\text{BF}_3 \cdot \text{MeOH}$.

Aqueceram-se os tubos em banho de óleo a $T = 100^\circ\text{C}$ durante 1 hora.

Arrefeceram-se os tubos em gelo e adicionar 5 mL de éter etílico.

Lavou-se com 1 mL de água desionizada e secou-se com sulfato de sódio anidro.

Injectou-se no cromatógrafo gasoso 1 μL de fase orgânica.

A análise de ácidos gordos por cromatografia gasosa efectuou-se após a sua conversão em ésteres metílicos, usando uma coluna DB Wax 30 m x 0.53 mm i.d., 1 μm ; e um detector FID. A temperatura do injetor foi de 205 °C, iniciando o programa de temperatura a 110 °C durante 5 minutos e aumentando gradualmente 3°C/min até 200°C. A temperatura do detector foi de 205 °C e o fluxo de gás de arraste (azoto) de 10 mL/min.

3.4. Determinação das constantes de partição em misturas binárias água:óleo de soja³⁶

Para a determinação de P_A^O dissolveu-se cada antioxidante (os hidrofílicos na fase aquosa e os hidrofóbicos na fase orgânica) de modo a que a concentração de antioxidante fosse de 3 mM em misturas binárias água:óleo de soja, constituídas por 6 mL de fase aquosa de tampão citrato 0,04 M, pH = 3,65, e 4 mL de óleo de soja livre de antioxidantes. Todas as determinações foram efectuadas em triplicado. De seguida preparou-se outra amostra nas mesmas condições mas sem antioxidante, a fim de ser usado como controlo.

Homogeneizou-se de seguida durante 1 minuto, num homogeneizador Polytron PT 1600 E, a uma velocidade de 20000 rpm. Transferiu-se a mistura de seguida para tubos de centrífuga e centrifugou-se durante 45 minutos, a 10000 rpm, para a separação das fases.

Após centrifugação, retiraram-se aliquotas de 1 mL de cada uma das fases e determinou-se a percentagem de antioxidante em cada fase espectrofotometria de UV a $\lambda=292$ nm.

De modo a quantificar a concentração de antioxidante em cada uma das fases, traçaram-se curvas de calibração absorvância vs concentração para cada antioxidante utilizando como solvente solução tampão citrato 0,04 M, pH=3,65 para a determinação da concentração de antioxidantes na fase aquosa, ou uma mistura BuOH:EtOH (50:50, v/v), para a determinação da concentração de antioxidante na fase oleosa.

Conhecidas as concentrações de antioxidante em cada uma das fases, o valor da constante de partição, P_A^O , foi determinado usando a seguinte expressão:

$$P_A^O = \frac{(AO_o)}{(AO_A)} = \frac{\%AO_o}{\%AO_A} \times \frac{V_A}{V_o}$$

3.5. Determinação de EC_{50} a partir do método de DPPH•

Pesaram-se 0,0162 gramas de DPPH• e dissolveram-se em 10 mL de metanol, tendo sido obtida uma solução de DPPH• concentrada de 4,108 mM. Dessa solução retirou-se uma alíquota de 50 μ L e perfez-se o volume a 20 mL, ficando a solução de DPPH• com uma concentração de 0,103 mM.

Para cada antioxidante, preparou-se uma solução rigorosa de $3,784 \times 10^{-5}$ moles em 10 mL de MeOH e desta solução, retiraram-se alíquotas de 50, 100, 150, 200, 250 e 300 μ L e perfez-se o volume a 10 mL, de modo a obter 6 soluções de concentração crescente.

Numa placa de 96 poços, colocaram-se em cada poço 250 μ L da solução de DPPH• de 0,103 mM e 50 μ L das várias soluções metanólicas de antioxidante preparadas a partir da solução-padrão (0,0310-0,1858 mol AO/ mol DPPH•)

No esquema estão representados [AO1] e [AO2], dado em cada placa se poder fazer a determinação da capacidade antiradicalar de dois compostos ao mesmo tempo. A distribuição da placa em relação aos antioxidantes encontra-se na Tabela 3.

Tabela 3: Esquema da placa BD Falcon de 96 poços com as distribuições dos antioxidantes a analisar

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	[AO1] ₅₀ + DPPH•					DPPH• + MeOH						
2	[AO1] ₁₀₀ + DPPH•											
3	[AO1] ₁₅₀ + DPPH•					[AO1] ₂₅₀ + DPPH•						
4	[AO1] ₂₀₀ + DPPH•					[AO1] ₃₀₀ + DPPH•						
5	[AO2] ₅₀ + DPPH•											
6	[AO2] ₁₀₀ + DPPH•					[AO2] ₂₅₀ + DPPH•						
7	[AO2] ₁₅₀ + DPPH•					[AO2] ₃₀₀ + DPPH•						
8	[AO2] ₂₀₀ + DPPH•											

Determinou-se a absorvância a 515 nm, recolhendo os dados a cada 5 minutos, durante 1 hora e 5 minutos, à temperatura de 25°C. Todos os ensaios foram realizados em quadruplicado. A capacidade antiradicalar foi expressa como EC_{50} , a quantidade necessária de antioxidante necessária para reduzir a quantidade de radicais em 50%.

3.6. Determinação da capacidade antiradicalar através do Teste de Estufa de Schaal

Prepararam-se emulsões com 6 mL de solução tampão citrato (0,04 M, pH = 3,65); 4 mL de óleo de soja livre de antioxidantes naturais e uma quantidade de Tween 20, de modo que a sua concentração na emulsão fosse 1%. Procedeu-se à adição de 50 µL de solução metanólica dos vários antioxidantes, de modo que a sua concentração fosse de 0,6 mM em 4 mL de óleo.

As amostras foram agitadas num homogeneizador (Polytron PT 1600 E), a uma velocidade de 20000 rpm, durante 1 minuto, e colocadas num orbital a uma temperatura de 37°.

Periodicamente, recolheram-se alíquotas de 50 µL de cada uma das emulsões, dissolveu-se em etanol a 10 mL, e quantificaram-se os dienos conjugados por espectrofotometria de UV a 233 nm, utilizando a seguinte expressão:

$$\%CD = \frac{1,0769 \times Abs}{C_{\text{óleo}}}$$

3.7. Determinação da distribuição de ésteres protocatecuatos em emulsões

A determinação da distribuição dos antioxidantes pelo modelo cinético procede-se em vários passos, nomeadamente:

- A síntese da sonda química – tetrafluorborato de hexadecilarenodiazónio.
- A preparação das emulsões.
- A preparação do agente acoplante – solução de dicloridrato de N-(naft-1-il)etilenodiamina (NED) em EtOH:BuOH 1:1 (v/v).
- A reacção do antioxidante com 16-Ar-N_2^+ e posterior reacção de 16-Ar-N_2^+ com NED.
- Determinação da concentração do corante azoico por espectrofotometria ($\lambda = 572 \text{ nm}$).

3.7.1. Síntese de tetrafluorborato de hexadecilarenodiazónio

Colocaram-se num gobelé com agitação e em banho de gelo-acetona, 4,5 mL de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ e 2,3380 g de 4-hexadecilanilina, dissolvidos no mínimo volume de THF.

De seguida, gota a gota, adicionaram-se 3,3 mL de BuONO, dando-se a reacção de diazotação.

Dada a adição de BuONO, deixou-se reagir durante 20 minutos e passado esse tempo dissolveu-se a mistura no mínimo de AcN e purificou-se o composto por recristalização com Et_2O .

Obtiveram-se 0,4202 gramas de um sólido branco e cristalino (rendimento de 13,71%), armazenado na ausência de luz e humidade e baixa temperatura (-20°C)

A preparação da solução de 16-Ar-N_2^+ em AcN, para ser utilizada como sonda no estudo das emulsões foi realizada pela pesagem de uma determinada massa e sua simples dissolução em 1 mL de AcN, num eppendorf opaco e escuro.

3.7.2. Preparação de Emulsões

Prepararam-se emulsões com 6 mL de solução tampão citrato (0,04M, pH = 3,65); 4 mL de óleo de soja livre de antioxidantes naturais, diferentes fracções de emulsionante

Tween 20 e com uma rigorosa massa de antioxidante, de modo que a proporção $[\text{AO}]:[16\text{-Ar-N}_2^+]$ fosse de pelo menos 10:1. Procedeu-se à agitação da mistura, com recurso a um agitador Polytron PT 1600 E, durante 1 minuto a 20000 rpm, e colocou-se de seguida numa célula termostatzada em agitação contínua durante 15 minutos, de modo a garantir uma temperatura constante de 25°C.

3.7.3. Preparação da solução de NED

Preparou-se a solução de dicloridrato de N-(naft-1-il)etilenodiamina (NED) dissolvendo 4,92 g NED em 500 mL de etanol quente. De modo a evitar a degradação desta mesma, preparou-se 1 L desta e armazenou-se em recipiente opaco, evitando a exposição ao ar.

Deixou-se arrefecer a solução e após atingir a temperatura ambiente, acertou-se o volume de EtOH até 500 mL, de modo a compensar o solvente perdido por evaporação. Juntaram-se 500 mL de BuOH, homogeneizou-se a solução e armazenou-se em recipiente isolado de luz.

3.7.4. Determinação das constantes de velocidade k_{obs}

Preparou-se uma série de tubos de ensaio selados contendo 2,5 mL de solução NED 0,0190 M. Uma vez termostatzada a emulsão a 25°C, adicionou-se uma alíquota de 16 μL da solução-padrão preparada de 16-Ar-N₂⁺ e, à medida que decorreu a reacção, retiraram-se alíquotas de 200 μL de emulsão, que se adicionou a cada um dos tubos previamente preparados. Uma vez terminada a reacção, indicada pela não formação do corante azóico, procedeu-se à análise dos tubos recolhidos por espectrofotometria, a 572 nm.

4. TRATAMIENTO DE RESULTADOS

4.1. Síntese dos protocatecuatos por catálise ácida.

Sintetizaram-se vários ésteres do ácido protocatecuico, a partir da reacção do mesmo com o respectivo álcool na presença de um catalisador ácido

Os rendimentos obtidos após purificação situam-se entre 9,21 e 91,64%, de acordo com a tabela 4.

Tabela 4: Resumo das sínteses dos ésteres protocatecuatos, com respectivos catalisadores e rendimentos

Antioxidante	Catalisador	Rendimento / %
C1PCA	H ₂ SO ₄ concentrado	91,64
C3PCA	H ₂ SO ₄ concentrado	48,56
C4PCA	H ₂ SO ₄ concentrado	35,52
C6PCA	p-TsOH	34,0
C8PCA	p-TsOH	30,5
C10PCA	p-TsOH	17,78
C12PCA	p-TsOH	19,34
C14PCA	p-TsOH	9,21
C16PCA	p-TsOH	13,23

O éster C1PCA encontrava-se puro após evaporação do álcool em excesso (metanol). Já os ésteres C3PCA e C4PCA foram purificados por recristalização em hexano.

À medida que a cadeia alquílica aumentou, a polaridade do álcool e do respectivo éster tornou-se cada vez mais semelhante, o que dificultou a sua purificação por recristalização e tendo sido necessário recorrer a uma coluna cromatográfica, para a purificação dos ésteres pretendidos.

Deste modo utilizou-se uma mistura equimolar de ácido e álcool, de modo a facilitar a separação do éster do álcool. Contudo essa diminuição da quantidade de álcool fez diminuir bastante o rendimento da reacção, pelo que foi necessário encontrar condições experimentais que melhorassem este rendimento.

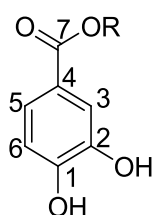
Verificou-se que a utilização de um outro catalisador e o aumento da temperatura de reacção para os 80°C melhorou o rendimento da reacção.

Dado que o objectivo era a obtenção dos compostos puros, a optimização da síntese para obter grandes rendimentos não foi uma prioridade, daí se ter sacrificado os rendimentos em prol dos estudos da distribuição e da actividade antioxidante.

4.1.1. Caracterização dos ésteres derivados do ácido protocatecuico

Os vários compostos sintetizados foram caracterizados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton (^1H -RMN) e carbono (^{13}C -RMN)

A figura 21 apresenta-nos a estrutura numerada do ácido protocatecuico e seus derivados, para futura numeração de cada sinal interpretado, em que n' ($n=1, 2, 3... 16$) corresponde ao carbono em questão (e seus hidrogénios associados) ao longo da cadeia alquílica. Foram também analisados os seus respectivos espectros de massa, onde se obteve os resultados apresentados em conjunto.



C_nPCA , ($n = 1 - 16$): $\text{R} = -(\text{CH}_2)_{n-1}-\text{CH}_3$, expressos de 1' a 16'

Figura 22: Esquema numerado para a interpretação dos espectros de RMN para os ésteres sintetizados

4.1.1.1. Protocatecuato de Metilo (C1PCA)

^1H RMN (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 7.50 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H3), 7.45 (dd, $J_{3,5} = 2.0$ Hz, $J_{5,6} = 8.0$ Hz, 1H, H5), 6.90 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H6), 3.80 (s, 3H, H1').

^{13}C RMN (101 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 167.08 (C7), 150.76 (C1), 145.62 (C2), 123.34 (C4), 122.89 (C5), 117.18 (C6), 115.80 (C3), 51.89 (C1').

MS: $m/z = 167,20$ $[\text{M} - \text{H}]^-$, $151,98$ $[\text{M} - \text{R} - 2\text{H}]^-$, $334,80$ $[2\text{M} - \text{H}]^-$

4.1.1.2. Protocatecuato de Etilo (C2PCA)

^1H RMN (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 7.50 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H3), dd, $J_{3,5} = 2.0$ Hz, $J_{5,6} = 8.0$ Hz, 1H, H5), 6.90 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H6), 4.27 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, H1'), 1.32 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, H2').

^{13}C RMN (101 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 166.55 (C7), 150.64 (C1), 145.54 (C2), 123.26 (C4), 123.21 (C5), 117.13 (C6), 115.72 (C3), 60.85 (C1'), 14.61 (C2').

MS: $m/z = 181,20$ $[\text{M} - \text{H}]^-$, $153,07$ $[\text{M} - \text{R} - \text{H}]^-$, $362,07$ $[2\text{M} - \text{H}]^-$

4.1.1.3. Protocatecuato de Propilo (C3PCA)

^1H RMN (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 7.52 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H3), 7.46 (dd, $J_{3,5} = 2.0$ Hz, $J_{5,6} = 8.0$ Hz, 1H, H5), 6.90 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H6), 4.18 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, H1'), 1.74 (sext, $J = 7.2$ Hz, 2H, H2'), 1.00 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, H3').

^{13}C RMN (101 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) 166.62 (C7), 150.69 (C1), 145.59 (C2), 123.28 (C4), 123.22 (C5), 117.15 (C6), 115.78 (C3), 66.46 (C1'), 22.85 (C2'), 10.76 (C3').

MS: $m/z = 195,27$ $[\text{M} - \text{H}]^-$, $153,13$ $[\text{M} - \text{R} - \text{H}]^-$, $390,73$ $[2\text{M} - \text{H}]^-$

4.1.1.4. Protocatecuato de Butilo (C4PCA)

^1H RMN (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 7.51 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H, H3), 7.45 (dd, $J_{3,5} = 2.0$ Hz, $J_{5,6} = 8.0$ Hz, 1H, H5), 6.90 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H6), 4.23 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, H1'), 1.71 (q, $J = 7.9$ Hz, 2H, H2'), 1.47 (sext, $J = 7.6$ Hz, 2H, H3'), 0.96 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, H4').

^{13}C RMN (101 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 166.70 (C7), 150.78 (C1), 145.68 (C2), 123.37 (C4), 123.33 (C5), 117.24 (C6), 115.86 (C3), 64.79 (C1'), 31.72 (C2'), 20.04 (C3'), 14.10 (C4').

MS: $m/z = 209,33$ $[\text{M} - \text{H}]^-$, $153,27$ $[\text{M} - \text{R} - \text{H}]^-$, $418,87$ $[2\text{M} - \text{H}]^-$

4.1.1.5. Protocatecuato de Hexilo (C6PCA)

^1H RMN (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 7.51 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, H3), 7.45 (dd, $J_{3,5} = 2.0$ Hz, $J_{5,6} = 8.3$ Hz, 1H, H5), 6.90 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H6), 4.23 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, H1'), 1.73 (q, $J = 7.9$ Hz, 2H, H2'), 1.45 (q, $J = 6.9$ Hz, 2H, H3'), 1.35 (m, 4H, H3'-H'4), 0.90 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, H6').

^{13}C RMN (101 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 166.70 (C7), 150.78 (C1), 145.69 (C2), 123.36 (C4), 123.33 (C5), 117.24 (C6), 115.86 (C3), 65.10 (C1'), 32.32 (C2), 29.51 (C3'), 26.56 (C4'), 23.32 (C5'), 14.36 (C6').

MS: $m/z = 237,33$ $[\text{M} - \text{H}]^-$, $153,08$ $[\text{M} - \text{R} - \text{H}]^-$, $474,87$ $[2\text{M} - \text{H}]^-$

4.1.1.6. Protocatecuato de Octilo (C8PCA)

^1H RMN (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 7.51 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H3), 7.45 (dd, $J_{3,5} = 2.0$ Hz, $J_{5,6} = 8.3$ Hz, 1H, H5), 6.90 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H6), 4.23 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, H1'), 1.73 (q, $J = 7.9$ Hz, 2H, H2'), 1.54 – 1.21 (m, 10H, H3'-H7'), 0.88 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, H8').

^{13}C RMN (101 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 166.61 (C7), 150.69 (C1), 145.61 (C2), 123.28 (C4), 123.23 (C5), 117.16 (C6), 115.77 (C3), 65.02 (C1'), 32.55 (C2'), 29.99 (C3'), 29.97 (C4'), 29.56 (C5'), 26.81 (C6'), 23.30 (C7'), 14.34 (C8').

MS: $m/z = 265,33$ $[\text{M} - \text{H}]^-$, $153,27$ $[\text{M} - \text{R} - \text{H}]^-$, $530,93$ $[2\text{M} - \text{H}]^-$

4.1.1.7. Protocatecuato de Decilo (C10PCA)

^1H RMN (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 7.51 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H5), 7.45 (dd, $J_{3,5} = 2.0$ Hz, $J_{5,6} = 8.3$ Hz, 1H, H5), 6.90 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H6), 4.23 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, H1'), 1.73 (q, $J = 7.9$ Hz, 2H, H2'), 1.53 – 1.22 (m, 14H, H3'-H9'), 0.87 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, H10').

^{13}C RMN (101 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ , 166.61 (C7), 150.69 (C1), 145.61 (C2), 123.26 (C4), 123.21 (C5), 117.17 (C6), 115.76 (C3), 65.02 (C1'), 32.62 (C2'), 30.29 (C4', C5', C6' C7'), 29.56 (C8'), 26.80 (C3'), 23.32 (C9'), 14.35 (C10').

MS: $m/z = 293,40$ $[\text{M} - \text{H}]^-$, $153,20$ $[\text{M} - \text{R} - \text{H}]^-$, $587,00$ $[2\text{M} - \text{H}]^-$

4.1.1.8. Protocatecuato de Dodecilo (C12PCA)

^1H RMN (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 7.51 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H3), 7.46 (dd, $J_{3,5} = 2.0$ Hz, $J_{5,6} = 8.3$ Hz, 1H, H5), 6.89 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H6), 4.23 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, H1'), 1.73 (q, $J = 7.9$ Hz, 2H, H2'), 1.51 – 1.18 (m, 18H, H3'-H11'), 0.87 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H, H12').

^{13}C RMN (101 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 166.62 (C7), 150.69 (C1), 145.62 (C2), 123.27 (C4), 123.21 (C5), 117.18 (C6), 115.77 (C3), 65.02 (C1'), 30.38 (C2'), 30.36 (C3'), 30.32 (C4'), 30.29 (C5'), 30.07 (C6'-C8'), 29.57 (C10'), 26.81 (C9'), 23.33 (C11'), 14.35 (C12').

MS: $m/z = 324,27$ $[\text{M} - \text{H}]^-$, $153,07$ $[\text{M} - \text{R} - \text{H}]^-$, $645,81$ $[2\text{M} - \text{H}]^-$

4.1.1.9. Protocatecuato de Tetradecilo (C14PCA)

^1H RMN (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 7.51 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H3), 7.45 (dd, $J = 8.3, 2.0$ Hz, 1H, H5), 6.89 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H6), 4.23 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, H1'), 1.79 – 1.68 (q, $J = 7.9$ Hz, 2H, H2'), 1.52 – 1.19 (m, 22H, H3'-H13'), 0.88 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H, H14').

^{13}C RMN (101 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 166.61 (C7), 150.70 (C1), 145.62 (C2), 123.26 (C4), 123.21 (C5), 117.16 (C6), 115.75 (C3), 65.01 (C1'), 30.45 (C2'), 30.37 (C3'), 30.33 (C4'), 30.30 (C5'), 30.08 (C6'-C9'), 29.57 (C12'), 26.81 (C11'), 26.71 (C10'), 23.33 (C13'), 14.36 (C14').

MS: $m/z = 349,47$ $[\text{M} - \text{H}]^-$, $153,07$ $[\text{M} - \text{R} - \text{H}]^-$, $699,07$ $[2\text{M} - \text{H}]^-$

4.1.1.10. Protocatecuato de Hexadecilo (C16PCA)

^1H RMN (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 7.51 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H3), 7.45 (dd, $J_{3,5} = 2.0$ Hz, $J_{5,6} = 8.3$ Hz, 1H, H5), 6.89 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H6), 4.23 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, H1'), 1.74 (q, $J = 8.0$ Hz, 2H, H2'), 1.53 – 1.22 (m, 26H, H3'-H15'), 0.88 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, H16').

^{13}C RMN (101 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) δ 165.70 (C7), 149.78 (C1), 144.70 (C2), 122.42 (C4), 122.37 (C5), 116.27 (C6), 114.86 (C3), 64.11 (C1'), 31.74 (C3'), 29.46 (C2'), 29.42 (C4'), 29.39 (C5'-C11'), 29.17 (C12'), 28.66 (C14'), 25.90 (C13'), 22.42 (C15'), 13.44 (C16').

MS: $m/z = 377,48$ $[\text{M} - \text{H}]^-$, $153,07$ $[\text{M} - \text{R} - \text{H}]^-$, $755,16$ $[2\text{M} - \text{H}]^-$

4.2. Determinação da composição em ácidos gordos de óleos alimentares por cromatografia gasosa

Analisaram-se 3 óleos alimentares diferentes: azeite, óleo de soja e óleo de milho. Efectuou-se a determinação da composição em ácidos gordos por cromatografia gasosa dos ésteres metílicos obtidos previamente por transesterificação. Utilizaram-se duas misturas contendo ácidos gordos de identidade conhecida a fim de obter os seus tempos de retenção e com isso, proceder à identificação dos constituintes da amostra.

A composição em ácidos gordos dos óleos alimentares analisados pode ser observada na tabela 5.

Tabela 5: Análise de Ácidos Gordos por cromatografia gasosa, e respectiva percentagem de cada constituinte

Tempo de Retenção	Ácido Gordo	Milho (%)	Soja (%)	Azeite (%)
13,96	Acido Palmítico	12,6	9,0	14,4
14,31	Ácido Palmitoleico	0	0	1,3
16,37	Ácido Esteárico	2,3	3,7	2,3
16,70	Ácido Oleico	30,2	27,6	73,2
17,34	Ácido Linoleico	53,4	53,7	7,1
18,21	Ácido Linolénico	0,8	5,1	1,3
18,67*		0,6	0	0,4
21,06*		0	0,9	0
TOTAL		100	100	100

*Estes ácidos foram detectados na cromatografia, no entanto por falta de padrões não foram identificados

Os valores obtidos estão de acordo com os esperados para cada tipo de óleo.^[25] Assim verificou-se o óleo de soja tem um elevado teor em ácido linoleico (53,7%) e mais baixo, mas significativo teor em ácido oleico. O óleo de soja, embora mais semelhante ao óleo de milho, possui uma percentagem significativamente maior de ácido linolénico, o que influencia a sua susceptibilidade à oxidação.

Analisando estes valores e atendendo à reactividade em relação à sua oxidação, em que o ácido linoleico é 40 vezes mais susceptível do que o ácido oleico, isto significa que o óleo de soja tem uma menor estabilidade em relação, por exemplo, ao azeite, pois o seu teor em ácido linoleico é muito maior, logo sofrerá uma oxidação muito mais rápida.

Foram também comparados estes valores com outros valores referenciados, sobre óleos de soja provenientes de outros países³⁷ dos quais se confirmou que não há grandes variações nas composições dos mesmos, sendo algumas mínimas diferenças, por efeitos de clima, produção e/ou processamento dos mesmos.

4.3. Determinação da capacidade antiradicalar: Método de DPPH[•]

O método de DPPH[•] baseia-se na monitorização espectrofotométrica da reacção entre o radical DPPH[•] e o antioxidante em estudo, num meio homogéneo (normalmente em metanol). À medida que se ocorre a reacção, dá-se a redução do radical corado DPPH[•], diminuindo a concentração de radicais livres, levando a uma redução da intensidade da cor.

Na figura 22 está representado um exemplo típico de variação de absorvância obtida para o desaparecimento do radical DPPH[•], em função do tempo, para diferentes concentrações de C1PCA.

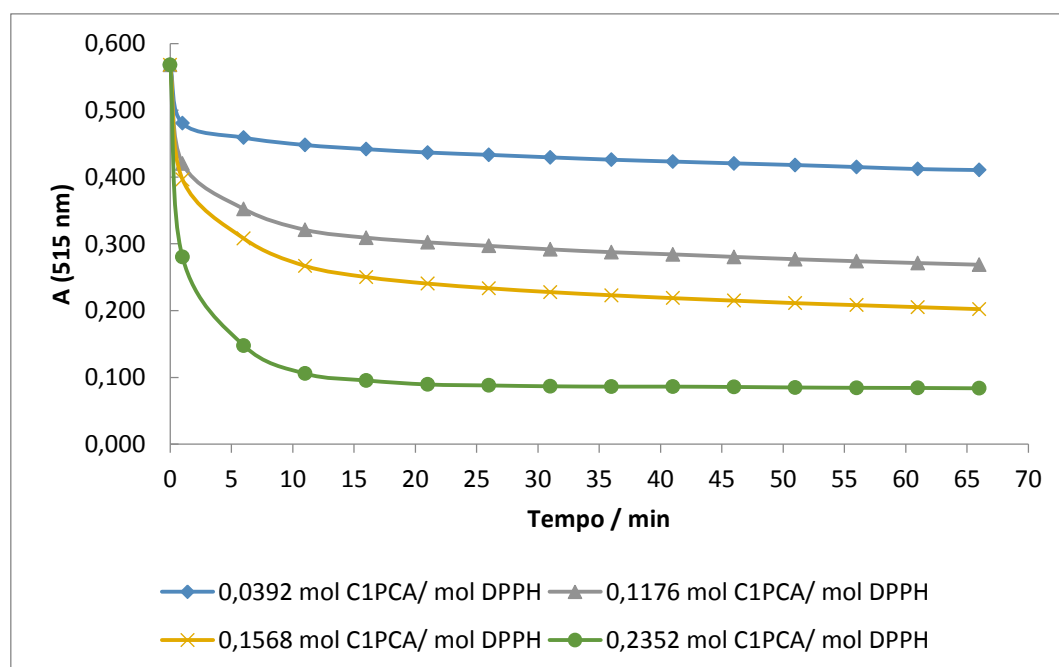


Figura 23: Representação gráfica de $A (\lambda=515 \text{ nm}) = f(t)$ da reacção entre DPPH[•] e C1PCA

A partir de uma recta de calibração previamente preparada para o DPPH[•], determinou-se a quantidade de DPPH[•] que ficou por reagir³⁸:

$$Abs = 0,0091[DPPH^{\bullet}] + 0,0006 \quad (1) \quad \%DPPH_{t=t} = \frac{|DPPH|_{t=0} - |DPPH|_{t=t}}{|DPPH|_{t=0}} \quad (2)$$

Traçou-se um gráfico $\%DPPH^{\bullet} = f(|AO|:|DPPH^{\bullet}|)$ (Figura 23) e a partir daqui possível determinar o parâmetro EC_{50} , ou seja, a proporção $|AO|:|DPPH^{\bullet}|$ necessária para a captação de 50% dos radicais DPPH[•] iniciais (Tabela 6).

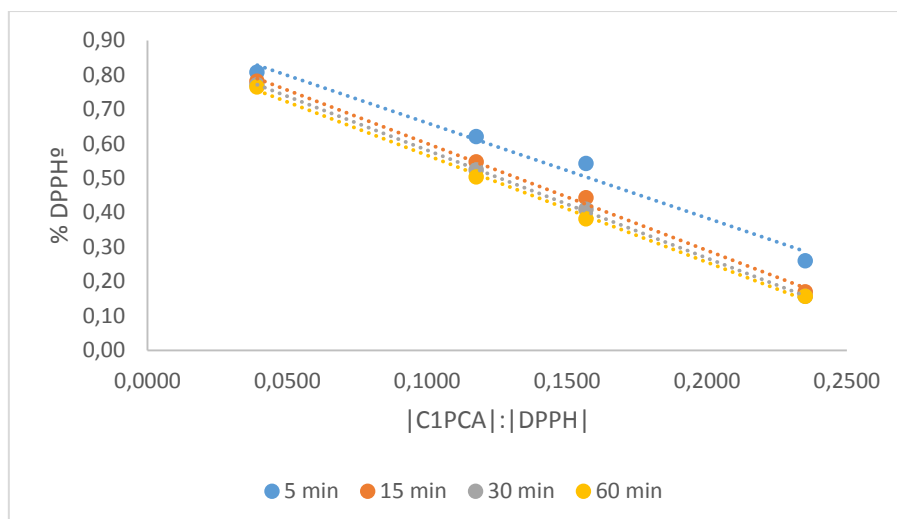


Figura 24: Representação de $\%DPPH = f([C1PCA]:[DPPH])$, para cada diferentes tempos de reacção

Tabela 6: Valores de EC_{50} para vários tempos de reacção

	$EC_{50} \pm \sigma$ (5 min)	$EC_{50} \pm \sigma$ (15 min)	$EC_{50} \pm \sigma$ (30 min)	$EC_{50} \pm \sigma$ (60 min)
PCA	0.689 ± 0.044	0.423 ± 0.0112	0.327 ± 0.004	0.262 ± 0.001
C1PCA	0.176 ± 0.006	0.139 ± 0.001	0.132 ± 0.001	0.129 ± 0.001
C2PCA	0.248 ± 0.003	0.199 ± 0.005	0.171 ± 0.003	0.152 ± 0.002
C3PCA	0.237 ± 0.001	0.183 ± 0.005	0.161 ± 0.001	0.148 ± 0.001
C4PCA	0.267 ± 0.012	0.206 ± 0.005	0.174 ± 0.004	0.144 ± 0.002
C6PCA	0.237 ± 0.005	0.180 ± 0.002	0.148 ± 0.001	0.128 ± 0.001
C8PCA	0.224 ± 0.005	0.154 ± 0.002	0.132 ± 0.004	0.125 ± 0.005
C10PCA	0.247 ± 0.012	0.151 ± 0.003	0.130 ± 0.002	0.120 ± 0.001
C12PCA	0.206 ± 0.007	0.155 ± 0.003	0.142 ± 0.007	0.127 ± 0.002
C14PCA	0.199 ± 0.009	0.136 ± 0.004	0.115 ± 0.002	0.107 ± 0.002
C16PCA	0.218 ± 0.003	0.165 ± 0.002	0.141 ± 0.002	0.129 ± 0.001

Atendendo à estrutura dos vários antioxidantes sintetizados e avaliados, a estrutura responsável pela reacção com os radicais (catecol) não sofreu qualquer alteração com a introdução das várias cadeia alquílicas. Assim, as reacções entre o DPPH• e os vários antioxidantes deu-se segundo o mesmo mecanismo uma vez que existe um valor semelhante do longo do tempo, para o EC_{50} , para todos os compostos sintetizados. Verificou-se que o ácido protocatecuico, contudo, apresentou uma reactividade diferente dos demais, tendo valores de EC_{50} mais elevados. Em meios polares, como é o caso do metanol, ocorrem pontes de hidrogénio com o solvente e entre moléculas, o que provoca um efeito de deslocalização de electrões do anel para facilitar essa ponte de hidrogénio. Como consequência, a libertação do hidrogénio fenólico torna-se mais difícil, o que faz do ácido protocatecuico menos reactivos que os restantes (ésteres protocatecuatos).

4.4. Determinação da eficácia antioxidante em emulsões: Teste de Estufa de Schaal

Foram analisadas ao longo de vários dias, emulsões em triplicado constituídas por 6 mL de tampão citrato (0,04 M, pH = 3,65), 4 mL de óleo de soja livre de antioxidantes naturais 0,1 g de Tween 20 e antioxidante, na concentração equivalente de 0,6 mM em 4 mL de óleo.

A Figura 24 representa o tempo necessário para que as emulsões atingissem uma percentagem de dienos conjugados de 0,6%, na presença dos vários antioxidantes estudados.

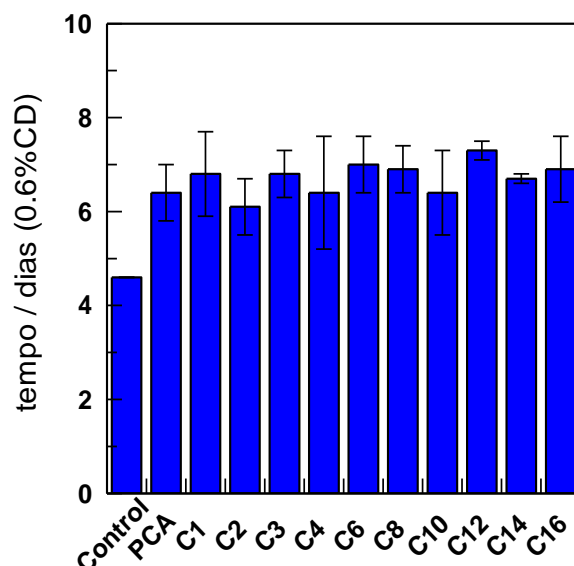


Figura 25: N° de dias para que as emulsões atinjam 0,6% em dienos conjugados, na presença dos vários antioxidantes, a uma temperatura de 37°C

Verificou-se que todos os compostos aumentaram a estabilidade das emulsões, contudo, de acordo com estes resultados, não houveram diferenças significativas no que toca à estabilidade das emulsões contendo os vários antioxidantes, tanto a 37°C como a 45°C, como se pode observar na figura 25.

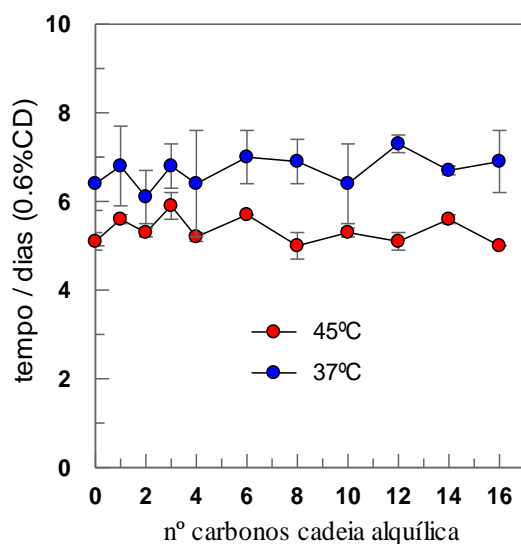


Figura 26: Tempo necessário para que as emulsões atinjam 0,6% de dienos conjugados, em função do tamanho da cadeia alquílica introduzida

A actividade antioxidante numa emulsão depende da sua reactividade frente aos radicais presentes e da sua distribuição entre as diferentes regiões da emulsão. Julga-se que a concentração de antioxidante na região mais susceptível à oxidação numa emulsão, a interface, deveria ter um papel muito importante na estabilidade das emulsões, uma vez que todos os antioxidantes estudados tem uma actividade antiradicalar semelhante. Deste modo, e dado que a actividade antioxidante foi muito semelhante para todos os compostos, espera-se que, apesar das diferentes cadeias alquílicas introduzidas no ácido protocatecuico, a distribuição destas moléculas em emulsões não poderá ser muito diferente.

4.5. Determinação das constantes de Partição P_A^O , em sistemas binários água:óleo de soja

A partir do método descrito na literatura³⁶, fez-se a quantificação dos vários antioxidantes por espectrofotometria nas fases aquosa e oleosa, calculando-se P_A^O do seguinte modo:

$$P_A^O = \frac{P_A^I}{P_O^I} = \frac{(AO_O)}{(AO_A)} = \frac{\%AO_O}{\%AO_A} \times \frac{V_A}{V_O}$$

Na tabela 7, apresentam-se os valores de %AO para cada fase e sua respectiva P_A^O .

Tabela 7: Percentagens dos diferentes antioxidantes presentes na fase aquosa e oleosa de uma mistura binária 4:6 óleo de soja:água e o seu valor de constante de partição P_A^O

	$\%AO_A$	$\%AO_O$	P_A^O
PCA	98.30	1.97	0.03±0.01
C1PCA	64.64	33.08	0.77±0.02
C2PCA	39.32	59.87	2.28±0.08
C3PCA	15.49	84.46	8.18±3.16
C4PCA	3.50	93.55	40.13 ±0.16
C8PCA	1.90	98.10	77.45±0.02
C10PCA	1.30	98.70	114±5
C12PCA	1.03	98.97	144±1
C16PCA	0.06	99.94	2498±100

Valores de $P_A^O < 1$ indicam-nos que estes são praticamente solúveis apenas em água, como é o caso do ácido protocatecuico. Este valor justifica-se pela estrutura química do composto, um ácido carboxílico com 2 grupos OH, que facilmente interagem com o meio aquoso, por pontes de hidrogénio, tornando-se este muito facilmente solúvel.

O valor de $P_A^O = 0.77 \pm 0.02$ para o C1PCA, de $P_A^O = 2.28 \pm 0.08$ para o C2PCA e de $P_A^O = 8.18 \pm 3.16$ para o C3PCA, mostram que estes compostos se distribuem significativamente pelas duas fases.

A partir do C4PCA, com um valor de $P_A^O > 40.13 \pm 0.16$ os compostos estão claramente dissolvidos no meio oleoso, havendo uma ínfima percentagem presente em água. No entanto, para estes compostos lipofílicos, a análise da solubilidade em meio aquoso é demasiado difícil, dado serem valores muito pequenos e qualquer perturbação na medição pode levar a mais erros, sendo estes valores de P_A^O mais passíveis de erro.

4.6. Determinação das constantes de Partição P_A^I e P_O^I em sistemas emulsionados água/tween 20/óleo de soja, a partir do modelo cinético de pseudofase

Utilizando o método de derivatização descrito em 1.5.2.1., obtiveram-se para cada fracção de emulsionante (entre 0,005 e 0,04 (v/v)), vários pares de dados $Abs = f(t)$. Esses pares de dados foram representados em gráfico, verificando-se o ajuste a uma cinética de ordem 1, a partir do qual foi possível obter o valor da velocidade da reacção, k_{obs} , para cada fracção de emulsionante ϕ_i .

Para um mesmo composto, estabeleceu-se uma relação entre k_{obs} e ϕ_i , a partir do qual se obtiveram as constantes de partição P_A^I e P_O^I

No caso de um antioxidante que em misturas binárias se encontrar principalmente numa das regiões pode-se aplicar o método cinético de pseudofase simplificado (1.5.2.2.), o que torna mais fácil o tratamento matemático dos resultados obtidos, dado que neste caso apenas é necessário obter uma constante de partição (P_A^I ou P_O^I , dependendo se este é hidrofílico ou lipofílico).

4.6.1. Análise da distribuição do C2PCA segundo o modelo cinético de pseudofase

Atendendo às características de solubilidade do composto C2PCA, este tem uma presença significativa nas duas fases da mistura binária (Tabela 8) .

Tabela 8: Percentagem de C2PCA presente na fase aquosa e oleosa de uma mistura binária 4:6 óleo de soja:água e o seu valor de constante de partição P_A^O

	$\%AO_A$	$\%AO_O$	P_A^O
C2PCA	39,32	59,87	2.28±0.08

Assim, pressupõe-se que este composto esteja presente significativamente nas três fases da emulsão, sendo assim necessárias duas constantes de partição: a constante de partição água:interface (P_A^I) e a constante de partição óleo:interface (P_O^I).

Portanto, analisaram-se para este composto, várias emulsões compostas como descrito anteriormente (emulsões 4:6 óleo de soja:água, com frações de emulsionantes compreendidas entre 0,005 e 0,04 (v/v), bem como uma quantidade rigorosa de C2PCA, de modo a obter uma concentração rigorosa deste na emulsão).

Na figura 25, temos a representação gráfica dos dados $A = f(t)$ e $\ln (A-A_{\text{inf}}) = f(t)$, sendo t o tempo medido em segundos, de onde se obteve a velocidade observada k_{obs} para um dado valor de ϕ_i , a partir do declive de $\ln (A-A_{\text{inf}}) = f(t)$.

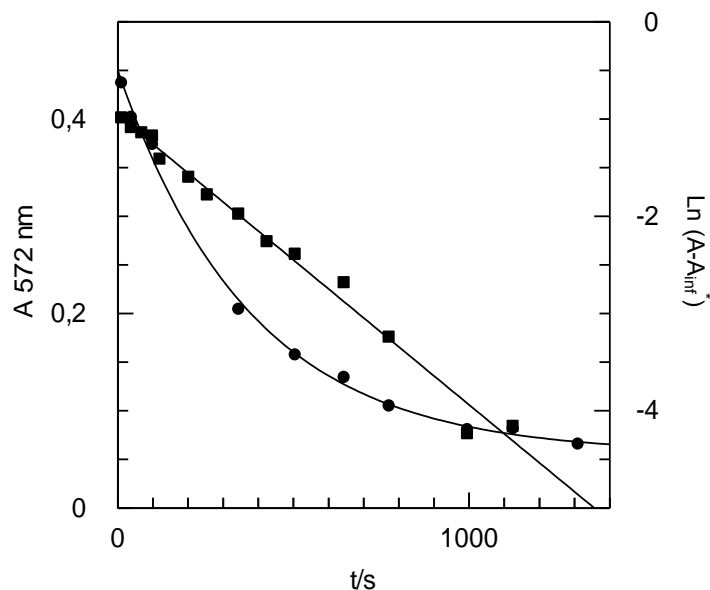


Figura 27: Gráfico representativo da reação de AO com 16-Ar-N_2^+

Condições Experimentais: $\phi_i = 0,0045$, $T = 25,0^\circ\text{C}$, $[16\text{-Ar-N}_2^+] = 2,81 \times 10^{-4} \text{ M}$, $[C2PCA] = 3,2 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[NED] = 0,019 \text{ M}$

A partir das representações gráficas de $A = f(t)$ e $\ln (A-A_{\text{inf}}) = f(t)$ para cada ϕ_i , pode-se assim relacionar $k_{\text{obs}} = f(\phi_i)$, bem como o respetivo ajuste $1/k_{\text{obs}} = f(\phi_i)$, como descrito na figura 28, de modo a obterem-se os parâmetros a e b desejados, que permitirão o cálculo das constantes de partição P_A^I e P_O^I .

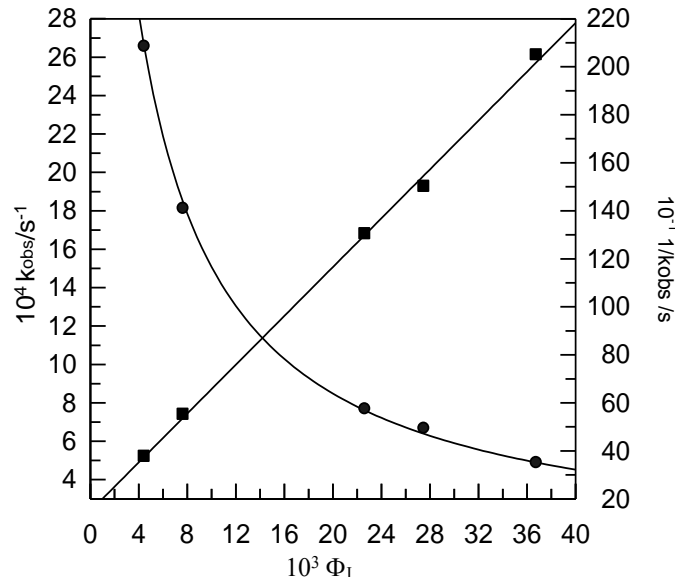


Figura 28: Representação de k_{obs} e $1/k_{obs}$ vs ϕ_I com os respectivos ajustes à equação 29, em 1.5.1.1., do C2PCA

Condições Experimentais: $T = 25,0^\circ\text{C}$, $[16\text{-Ar-N}_2^+] = 2,81 \times 10^{-4} \text{ M}$, $[C2PCA] = 3,2 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[NED] = 0,019 \text{ M}$

$$k_{obs} = \frac{a}{b\phi_I + 1} \leftrightarrow \begin{cases} b = \frac{P_A^I P_O^I (1 + \frac{\phi_A}{\phi_O})}{P_A^I + \frac{\phi_A}{\phi_O} P_O^I} - 1 \\ P_A^O = \frac{P_A^I}{P_O^I} \\ a = |AO| \cdot k_I \cdot \frac{P_A^I P_O^I (1 + \frac{\phi_A}{\phi_O})}{P_A^I + \frac{\phi_A}{\phi_O} P_O^I} \end{cases}$$

Assim, a partir do ajuste do gráfico obtiveram-se os seguintes valores dos parâmetros a e b .

Tabela 9: Parâmetros gráficos relativos ao ajuste da equação $k_{obs} = f(\phi_I)$

Condições Experimentais: $T = 25,0^\circ\text{C}$, $[16\text{-Ar-N}_2^+] = 2,81 \times 10^{-4} \text{ M}$, $[NED] = 0,019 \text{ M}$

	$ AO /\text{M}$	a	b
C2PCA	$3,2 \times 10^{-3}$	0,00670	348,976

Sabendo a constante de partição P_A^O é possível então resolver o sistema de 3 equações para 3 incógnitas (k_I , P_O^I e P_A^I), em que:

$$\left\{ \begin{array}{l} 348,976 = \frac{P_A^I P_O^I (1 + \frac{6}{4})}{P_A^I + \frac{6}{4} P_O^I} - 1 \\ 2,28 = \frac{P_A^I}{P_O^I} \\ 0,00670 = 3,2 \times 10^{-3} \cdot k_I \cdot \frac{P_A^I P_O^I (1 + \frac{6}{4})}{P_A^I + \frac{6}{4} P_O^I} \end{array} \right. \Leftrightarrow \left\{ \begin{array}{l} P_O^I = 226,96 \\ P_A^I = 517,27 \\ k_I = 0,00616 \end{array} \right.$$

obtendo-se os valores de $P_A^I = 517,27$ e $P_O^I = 226,96$.

A partir da determinação das constantes de partição em sistemas emulsionados, determinou-se a percentagem de C2PCA presente nas diferentes fases da emulsão em função de ϕ_i , de acordo com as equações 32, 33 e 34 em 1.5.2.1 (Figura 29).

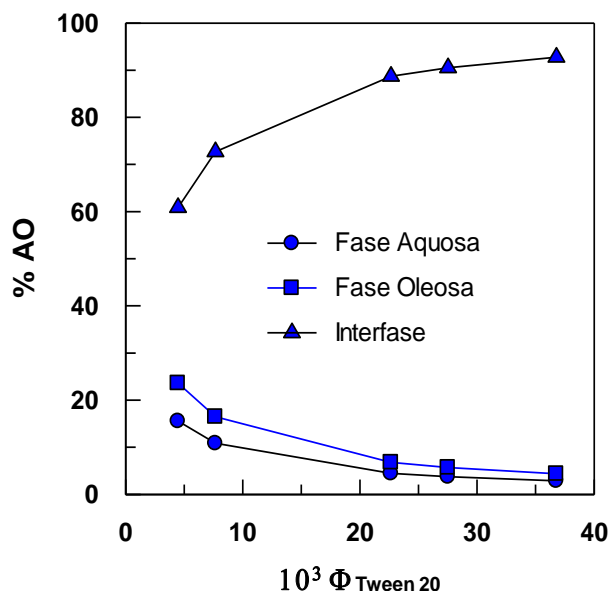


Figura 29: Variação da percentagem de C2PCA nas várias fases da emulsão.

Condições Experimentais: $T = 25,0^\circ\text{C}$, $[16\text{-Ar-N}_2^+] = 2,81 \times 10^{-4} \text{ M}$, $[C2PCA] = 3,2 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[NED] = 0,019 \text{ M}$

O C2PCA encontra-se maioritariamente na interface (cerca de 60%), encontrando-se entre 15 e 25% nas fases aquosa e oleosa, respectivamente. A percentagem de C2PCA na interface aumenta com o aumento de ϕ_i , sendo que a partir de $\phi_i > 0,0275$, a percentagem de C2PCA presente na interface está acima de 90%, estando os restantes 10% distribuídos pelas fases oleosa e aquosa.

4.6.2. Análise da distribuição do C4PCA, C8PCA, C10PCA, C12PCA e C16PCA segundo o modelo cinético de pseudofase simplificado

Dado que estes compostos estão maioritariamente presentes na fase oleosa no sistema binário, como descrito na tabela 10, o tratamento matemático torna-se mais simples, dado que apenas é necessário a determinação de P_O^I .

Neste caso, prevê-se apenas a distribuição dos mesmos entre as fases oleosa e interface, assumindo assim que a concentração na fase aquosa é nula.

Tabela 10: Percentagens dos antioxidantes lipofílicos presentes na fase aquosa e oleosa de uma mistura binária 4:6 óleo de soja:água e o seu valor de constante de partição P_A^O

	$\%AO_A$	$\%AO_O$	P_A^O
C4PCA	3,50	93,55	40.13 ±0.16
C8PCA	1,9	98,1	77.45±0.02
C10PCA	1,3	98,7	114±5
C12PCA	1,03	98,97	144±1
C16PCA	0,06	99,94	2498±100

Portanto, analisaram-se para cada composto, várias emulsões compostas como descrito anteriormente (emulsões 4:6 óleo de soja:água, com fracções de emulsionantes compreendidas entre 0,005 e 0,04 (v/v), bem como uma quantidade rigorosa dos vários antioxidantes estudados, de modo a obter uma concentração rigorosa destes na emulsão).

Na figura 30, temos a representação gráfica de $A = f(t)$ e $\ln(A - A_{inf}) = f(t)$ para uma emulsão contendo C4PCA, sendo t o tempo medido em segundos, de onde se obtém uma velocidade observada k_{obs} , para um dado valor de ϕ_i , a partir do declive de $\ln(A - A_{inf}) = f(t)$.

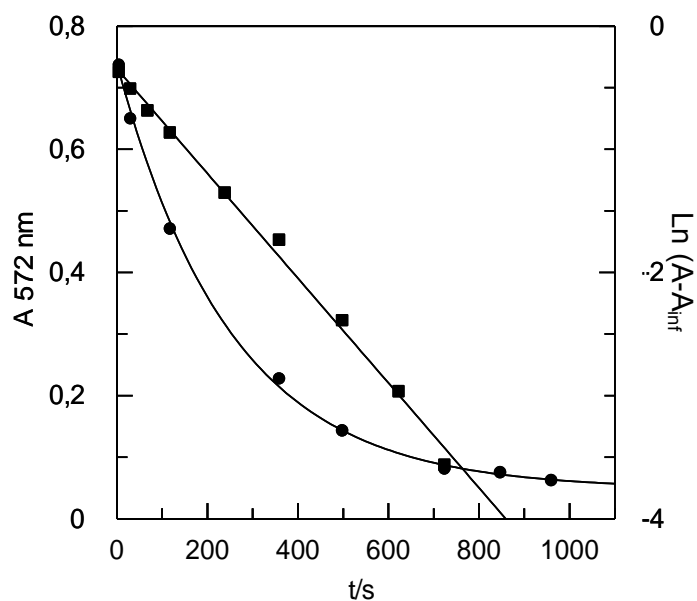


Figura 30: Gráfico representativo da reação de AO com 16-Ar-N₂⁺.

Condições Experimentais: $\phi_I = 0,00493$, $T = 25,0^\circ\text{C}$, $[16\text{-Ar-N}_2^+] = 2,81 \times 10^{-4} \text{ M}$, $[C4PCA] = 3,13 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[NED] = 0,019 \text{ M}$

Obtendo os vários pares de dados $A = f(t)$ e $\text{Ln}(A - A_{\text{inf}}) = f(t)$ para cada ϕ_I , pode representar-se graficamente $k_{\text{obs}} = f(\phi_I)$, bem como o respectivo ajuste $1/k_{\text{obs}} = f(\phi_I)$, como descrito na figura 31, de modo a obter os parâmetros a e b , que permitirão calcular o valor de P_0^I .

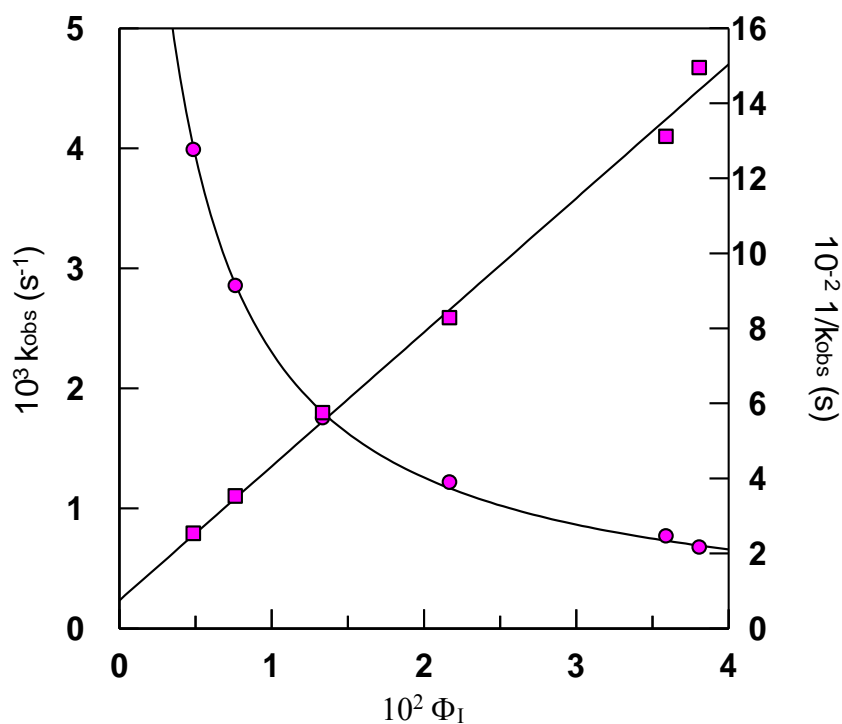


Figura 31: Representação de k_{obs} e $1/k_{\text{obs}}$ vs ϕ_I com os respectivos ajustes às equações 38 e 39 em 1.5.1.2., do C4PCA

Condições Experimentais: $T = 25,0^\circ\text{C}$, $[16\text{-Ar-N}_2^+] = 2,81 \times 10^{-4} \text{ M}$, $[C4PCA] = 3,2 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[NED] = 0,019 \text{ M}$

O mesmo tratamento foi efectuado para os compostos C8PCA, C10PCA, C12PCA e C16PCA (Figura 32 a 35)

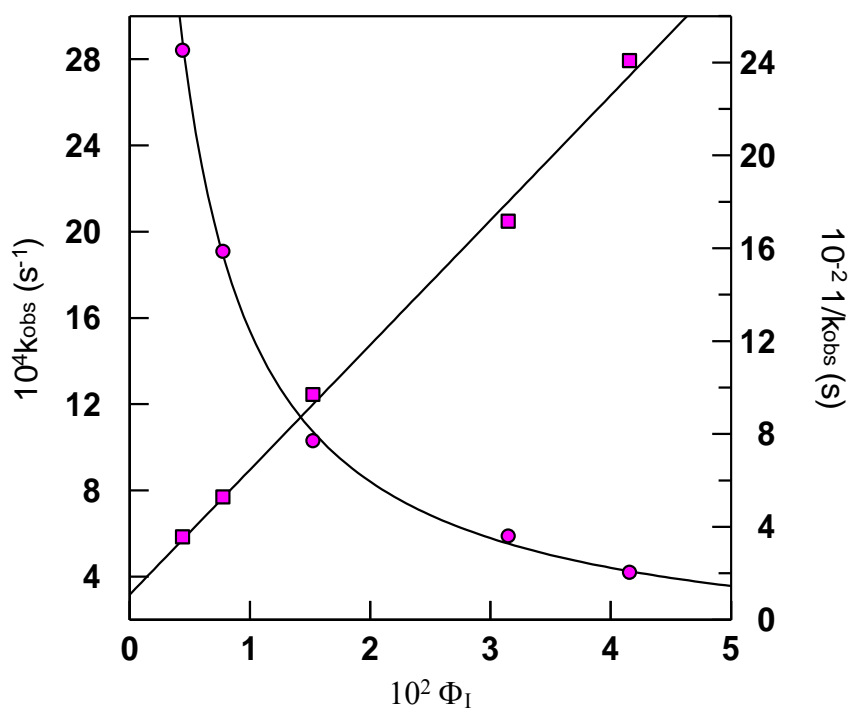


Figura 32: Representação de k_{obs} e $1/k_{obs}$ vs ϕ_I com os respectivos ajustes às equações 38 e 39 em 1.5.1.2., do C8PCA

Condições Experimentais: $T = 25,0^\circ C$, $[16-Ar-N_2^+] = 2,81 \times 10^{-4} M$, $[C8PCA] = 2,5 \times 10^{-3} M$, $[NED] = 0,019 M$

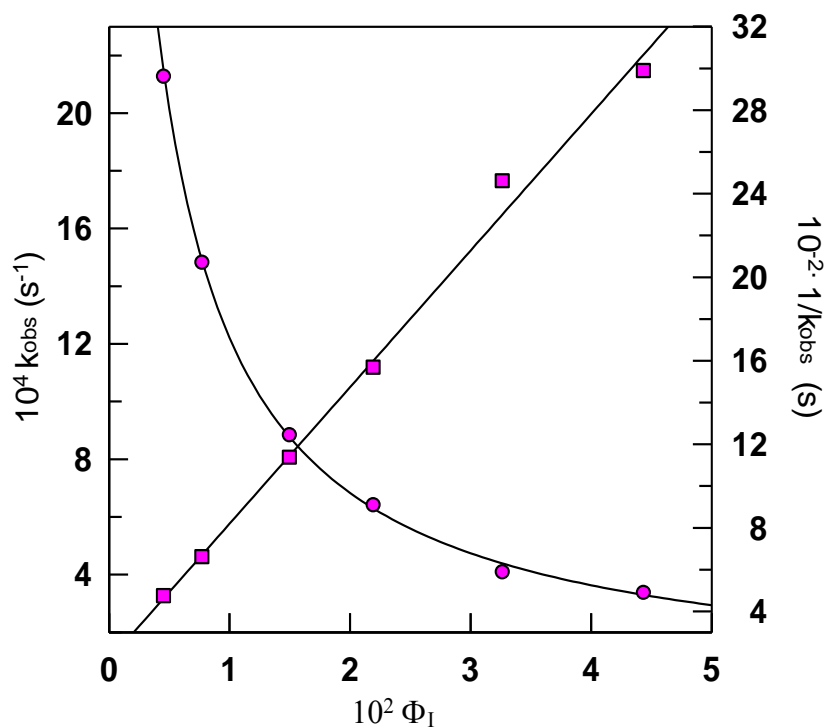


Figura 33: Representação de k_{obs} e $1/k_{obs}$ vs ϕ_I com os respectivos ajustes às equações 38 e 39 em 1.5.1.2., do C10PCA

Condições Experimentais: $T = 25,0^\circ C$, $[16-Ar-N_2^+] = 2,81 \times 10^{-4} M$, $[C10PCA] = 2,5 \times 10^{-3} M$, $[NED] = 0,019 M$

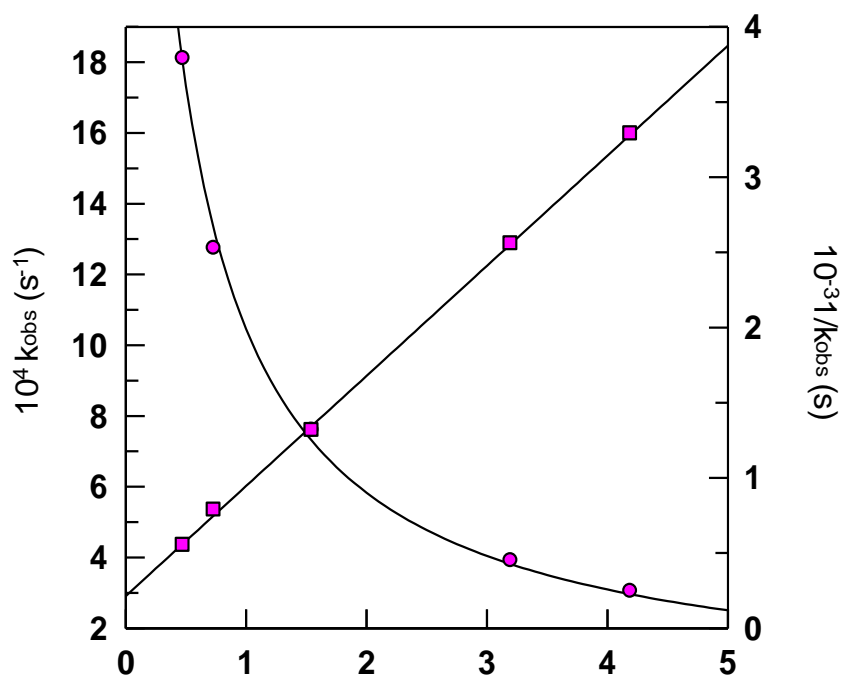


Figura 34: Representação de k_{obs} e $1/k_{obs}$ vs ϕ_I com os respectivos ajustes às equações 38 e 39 em 1.5.1.2., do C12PCA
Condições Experimentais: $T = 25,0^\circ C$, $|16-Ar-N_2^+| = 2,81 \times 10^{-4} M$, $|C12PCA| = 2,5 \times 10^{-3} M$, $|NED| = 0,019 M$

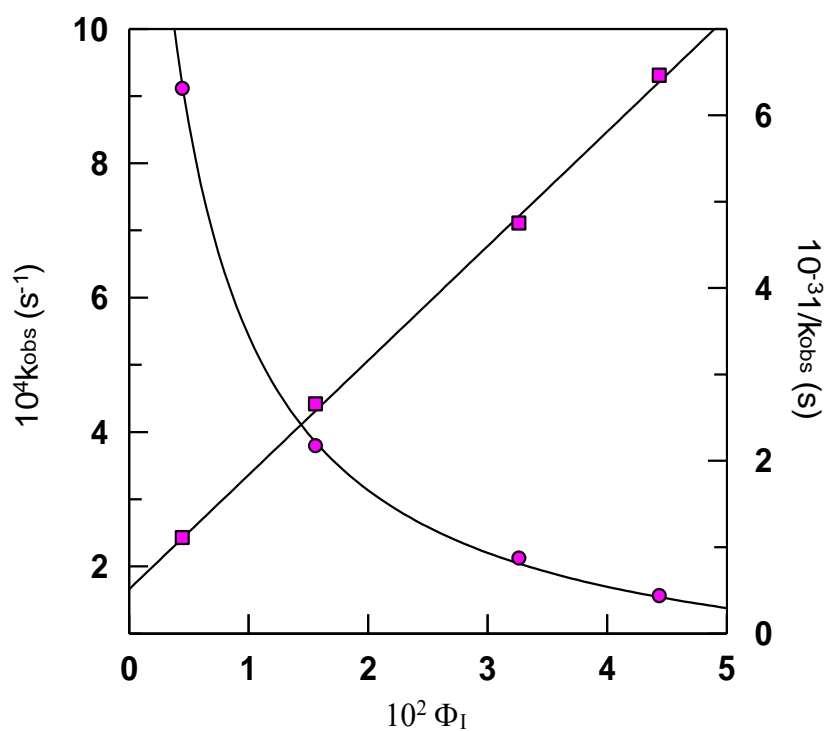


Figura 35: Representação de k_{obs} e $1/k_{obs}$ vs ϕ_I com os respectivos ajustes às equações 38 e 39 em 1.5.1.2., C16PCA
Condições Experimentais: $T = 25,0^\circ C$, $|16-Ar-N_2^+| = 2,81 \times 10^{-4} M$, $|C16PCA| = 2,0 \times 10^{-3} M$, $|NED| = 0,019 M$

A partir da equação $k_{obs} = f(\phi_I)$ e dos parâmetros a e b , foi possível obter o valor de P_O^I , dado que:

$$k_{obs} = \frac{ab}{b\phi_I + 1} \leftrightarrow \begin{cases} b = \frac{P_O^I}{\phi_O} \\ a = |AO| \cdot k_I \end{cases}$$

Assim, a partir do ajuste do gráfico obtiveram-se os valores dos parâmetros gráficos *a* e *b*.

Tabela 11: Parâmetros gráficos relativos ao ajuste da equação $k_{obs} = f(\phi_I)$

Condições Experimentais: $T = 25,0^\circ\text{C}$, $[16\text{-Ar-N}_2^+] = 2,81 \times 10^{-4} \text{ M}$, $[NED] = 0,019 \text{ M}$

	$ AO /M$	<i>a</i>	<i>b</i>
C4PCA	0,0032	$2,7987 \times 10^{-5}$	479,059
C8PCA	0,0025	$1,8599 \times 10^{-5}$	499,204
C10PCA	0,0025	$1,5293 \times 10^{-5}$	394,716
C12PCA	0,0025	$1,3657 \times 10^{-5}$	342,109
C16PCA	0,0020	$7,5490 \times 10^{-6}$	259,2904

Neste caso, o valor da constante de partição P_A^O não é necessário, uma vez que é possível resolver o sistema de 2 equações para 2 incógnitas (k_I e P_O^I), em que:

$$\begin{cases} 2,7987 \times 10^{-5} = 3,2 \times 10^{-3} \cdot k_I \\ 479,059 = \frac{P_O^I}{\frac{4}{10}} \end{cases} \leftrightarrow \begin{cases} P_O^I = 192,80 \\ k_I = 0,00894 \end{cases}$$

Efectuaram-se os mesmos cálculos para os restantes antioxidantes tendo-se obtido os valores de P_O^I e k_I para todos os compostos, apresentados na tabela 12.

Tabela 12: Parâmetros analisados para os antioxidantes lipofílicos, com base no modelo cinético de pseudofase simplificado

	P_O^I	$k_I \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$
C4PCA	192±80	0,0089±0,0003
C8PCA	200±54	0,0079±0,0003
C10PCA	158±51	0,0059±0,0002
C12PCA	136±13	0,0055±0,0006
C16PCA	104±18	0,0039±0,0001

Os valores de P_O^I situam-se entre os 100 e os 200 (unidades adimensionais), aumentando do C4PCA até C8PCA, diminuindo depois a partir deste, com o aumento da cadeia alquílica.

Uma vez conhecendo o valor da constante de partição em sistemas emulsionados P_O^I , determinou-se a percentagem dos antioxidantes presente nas fases oleosa e interface

da emulsão em função de ϕ_i , de acordo com as equações 42 e 43 em 1.5.2.2. (Figura 36).

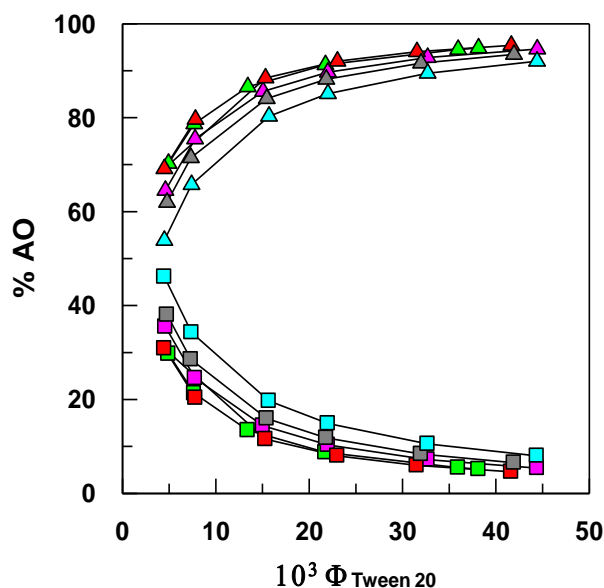


Figura 36: Distribuição dos antioxidantes lipofílicos nas várias fases da emulsão
Condições Experimentais: $T = 25,0^{\circ}\text{C}$, $[16\text{-Ar-N}_2^+] = 2,81 \times 10^{-4} \text{ M}$, $[NED] = 0,019 \text{ M}$

Os antioxidantes encontram-se distribuídos na interface (entre 50 e 70%), estando os restantes distribuídos na região oleosa. A percentagem dos mesmos à medida que aumenta a fracção de emulsioante, ϕ_i , aumenta, até um máximo de 95% sendo que a partir de $\phi_i > 0,025$, estes se encontram ao nível dos 90% na interface. Verifica-se assim que a quantidade de emulsionante presente influencia significativamente a distribuição dos antioxidantes. Verifica-se igualmente que não existem diferenças significativas na distribuição dos mesmos para valores de ϕ_i mais altos, em que todos os antioxidantes se encontram entre 91 e 93% na interface, ao contrário do que acontece na distribuição dos mesmos antioxidantes para ϕ_i mais baixas (0,005), cuja presença na interface pode ir de 53% a 69%.

Uma vez conhecida a percentagem de protocatecuatos na região interfacial, determinou-se a molaridade interfacial.

Esta fora calculada da seguinte forma, dado que:

$$(AO_I) = \frac{n_I}{V_I} = \frac{n_T(\%AO_I)}{V_I} = \frac{\frac{n_T}{V_T}(\%AO_I)}{\frac{V_I}{V_T}} = \frac{|AO|\%AO_I}{\phi_I}$$

em que n representa o nº de moles, V o volume, e os índices I e T a região interfacial e o total (estequimétrico) respectivamente e ΦI a fracção de emulsionante.

A Figura 37A mostra-nos o decréscimo da concentração interfacial dos protocatecuatos em emulsões 4:6 óleo de soja:água, à medida que aumenta a quantidade de emulsionante. Os resultados indicam que para cada antioxidante, a concentração ao nível da interface decresce exponencialmente entre 6-7 vezes ao longo aumento da fracção de emulsionante de $\Phi_I = 0.005$ para $\Phi_I = 0.04$.

A figura 37B representa o efeito do tamanho da cadeia alquílica na concentração interfacial de AO para as mesmas emulsões, contendo diferentes Φ_I .

Em suma, a distribuição resultante nas emulsões mostra que:

- A concentração de antioxidante interfacial (AO_I) de qualquer éster é muito maior (~20 vezes para $\phi_I = 0,005$ e ~ 150 vezes para $\phi_I = 0,04$) do que a concentração estequiométrica do AO. Isto é uma observação notável uma vez que a velocidade da reacção entre os radicais e AOs depende das concentrações interfaciais.
- A concentração interfacial de antioxidante (AO_I) é semelhante para antioxidantes de hidrofobicidade intermédia (por exemplo, C4PCA, C8PCA) e relativamente superior (diferenças de menos de 10%), comparando com os antioxidantes mais hidrofóbicos (C10PCA, C12PCA, C16PCA), para a fracção de menor volume de emulsionante ($\phi_I = 0,005$).
 - De notar que encontram-se diferenças maiores que 50% para os ésteres C8 e C16 do hidroxitirosol na $\phi_I = 0,005$.⁴⁰
- A variação da concentração de antioxidante interfacial (figura 37B) com o tamanho da cadeia alquílica é mais significativa a valores mais baixos de ϕ_I do que para valores mais elevados. A altas ϕ_I , a fracção de protocatecuatos incorporada na região interfacial é muito semelhante.

Deste modo, os resultados mostram claramente que o principal parâmetro de controlo da distribuição dos protocatecuatos é a concentração de emulsionante.

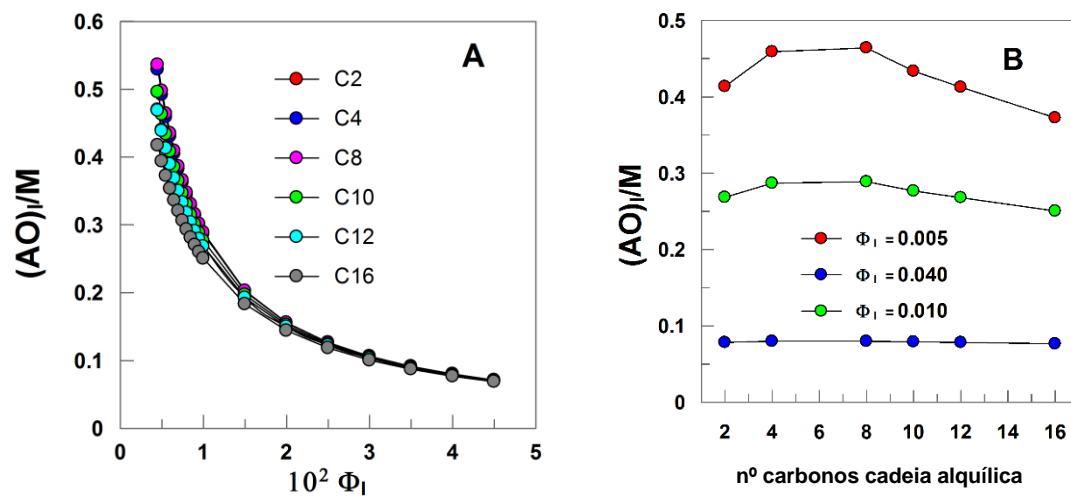


Figura 37: A: Distribuição da concentração interfacial em função da fracção de emulsionante ; B: Distribuição da concentração interfacial dos AO em função do tamanho da cadeia alquílica, para várias fracções de emulsionante

4.7. Análise comparativa da correlação entre a actividade antioxidante e a distribuição dos derivados ésteres do ácido protocatecuico

Verificou-se que todos os antioxidantes estudados se distribuíam de modo semelhante, encontrando-se todos numa percentagem bastante semelhante na interface (~90%) para fracções de emulsionante elevadas. Assim, verificou-se que a esterificação com grupos alquila de vários tamanhos não causou grande efeito na distribuição dos antioxidantes estudados, como se pode verificar na figura 38, para emulsões preparadas com $\phi_i > 0,025$.

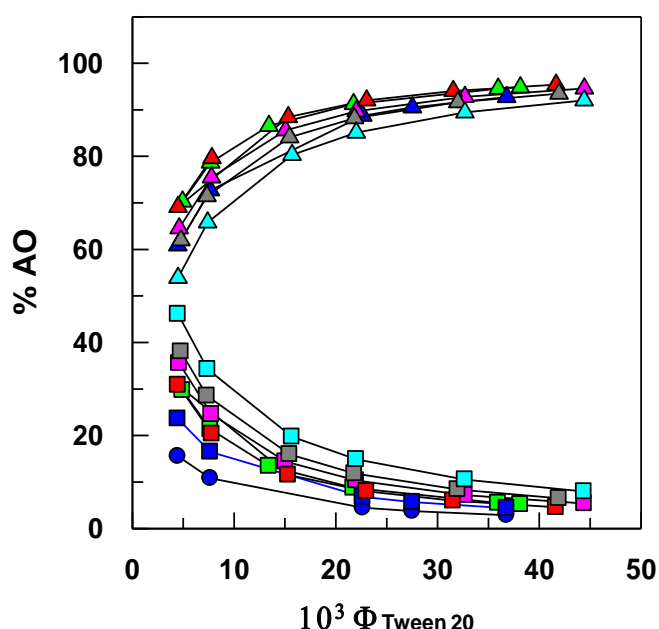


Figura 38: Representação da distribuição dos vários antioxidantes na interface

Fase Aquosa: ● – C2PCA;
Interface: ▲ – C2PCA; ▲ – C4PCA; ▲ – C8PCA; ▲ – C10PCA; ▲ – C12PCA; ▲ – C16PCA
Fase Oleosa: ■ – C2PCA; ■ – C4PCA; ■ – C8PCA; ■ – C10PCA; ■ – C12PCA; ■ – C16PCA

No entanto, pode observar-se uma pequena diferença na distribuição dos mesmos para valores de ϕ_i mais baixos, como 0,005.

A eficácia dos antioxidantes está relacionada com a presença dos antioxidantes na interface, e observa-se que a percentagem de C8PCA na interface é maior que a do C16PCA e maior que a do C2PCA. No entanto essa diferença é muito pequena.

Assim, observou-se a inexistência de diferente actividade antioxidante para os vários antioxidantes estudados em emulsões água/tween 20/óleo de soja, $\phi_i = 1\%$ (Figura 39).

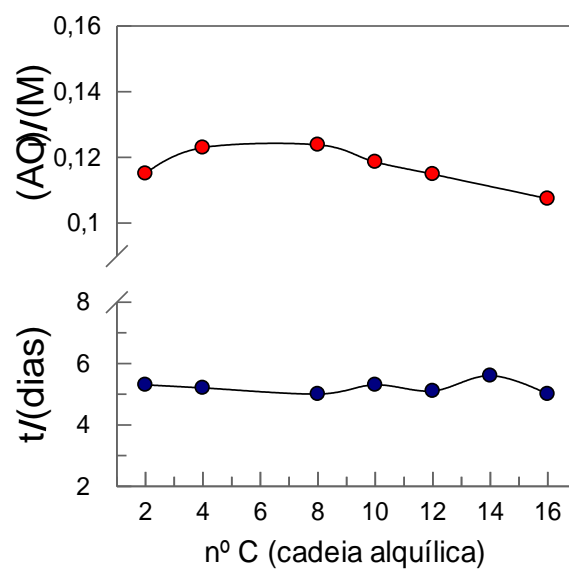


Figura 39: Correlação entre $(AOI) = f(n^{\circ}C)$ e $tempo = f(n^{\circ}C)$

A diminuição da ϕ_I para 0,5% poderia mostrar-nos alguma diferença na actividade antioxidante dos vários compostos, ao longo do teste de Schaal, o que no caso de 1%, não se verificou. No entanto esta hipótese não foi ainda testada.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo vem confirmar e complementar estudos anteriores efectuados, com outras famílias de antioxidantes.

Como não há qualquer alteração ao nível do grupo catecol, responsável pela actividade antiradicalar, a capacidade antiradicalar dos vários ésteres frente ao radical DPPH• prevê-se constante. Todos os compostos sintetizados seguem normalmente uma cinética de reacção com o radical DPPH• um comportamento muito similar, não havendo diferenças significativas entre eles. Entre os vários ésteres e o ácido fenólico que lhes deu origem, ocorre em alguns casos um aumento da actividade antiradicalar, causada sobretudo pela ausência de interacção entre o grupo carboxílico e o solvente polar, como mencionado anteriormente. Dado esta “competição” entre o solvente e o DPPH•, a eficiência dos ácidos é normalmente menor.

Assim, qualquer diferença na actividade antioxidante dos compostos em emulsões é principalmente causada pela diferente distribuição dos antioxidantes pelas várias fases da emulsão. Na presença de 1% de emulsionante, e apesar de todos os compostos apresentarem actividade antioxidante, não houveram grandes diferenças na actividade antioxidante entre os compostos analisados.

De facto verificou-se que o efeito da reacção do aumento da cadeia alquilo não teve grande influência na distribuição dos compostos, isto é, todos os ésteres, de cadeias curtas ou de cadeias longas, mostraram distribuição na interface muito semelhante, estando todos os compostos em grande percentagem na mesma.

Assim verificou-se mais uma vez uma correlação direta entre a percentagem de antioxidante na interface e a sua atividade antioxidante.

Uma vez que as diferenças na distribuição dos antioxidantes será maior para ϕ_1 menores ($\sim 0,005$), será interessante verificar no futuro se ocorrem diferenças na atividade antioxidante dos compostos, e, se possível, observar o efeito cut-off.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Antoniasse, R. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos* **2001**, 19, 353.
- (2) Schach, K. M. In *Lipid Oxidation – Challenge in Food Systems*; Logan, A., Nienaber, U., Pan, X. S., Eds.; American Oil Chemists' Society Press: Urbana, IL, USA, 2013.
- (3) Silva, F. A. M. B., M.F.M e Ferreira, M.A. *Química Nova* **1999**, 22.
- (4) Shahidi, F., Yung, J., Rubin, L.J., Wood, D.F. *Journal of Canadian Institute of Food Science and Technology* **1987**, 20, 104.
- (5) Frankel, E. N. *Progress in Lipid Research* **1980**, 19, 1.
- (6) Frankel, E. N. *Lipid Oxidation*; The Oily Press: Dundee, UK, 1998.
- (7) Porter, W. L. In *Antioxidants: Chemical, Physiological, Nutritional and Toxicological Aspects*; Priceton Scientific: Princeton, NJ, 1993, p 93.
- (8) Uri, N. In *Autoxidation and Antioxidants*; Lundberg, W. O., Ed.; Interscience Publishers: 1961; Vol. 1.
- (9) Simpson, T. H.; Uri, N. *Chemistry and Industry* **1956**, 956.
- (10) Chipault, J. R.; Mizuno, G. R.; Lundberg, W. O. *Food Technology* **1956**, 10, 209.
- (11) Porter, W. L. In *Autoxidation in Food and Biological Systems*; Simic, M. G., Karel, M., Eds.; Plenum Press: New York, 1980, p 295.
- (12) Stöckmann, H.; Schwarz, K.; Huynh-Ba, T. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **2000**, 77, 535.
- (13) Laguerre, M.; López-Giraldo, L. J.; Lecomte, J.; Figueroa-Espinoza, M. J.; Baréa, B.; Weiss, J.; Decker, E. A.; Villeneuve, P. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **2009**, 57, 11335.
- (14) Laguerre, M. M.; López-Giraldo, L. J.; Lecomte, J.; Figueroa-Espinoza, M. J.; Baréa, B.; Weiss, J.; Decker, E. A.; Villeneuve, P. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **2010**, 58, 2869.
- (15) Halliwell, B.; Murcia, M. A.; Chirico, S.; Aruoma, O. I. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **1995**, 35, 7.
- (16) Kumamoto, M.; Sonda, T.; Nagayama, K.; Tabata, M. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **2001**, 65, 126.
- (17) Robbins, K.; Schroeder, W. In *Lipid Oxidation – Challenge in Food Systems* Logan, A., Nienaber, U., Pan, X. S., Eds.; American Oil Chemistry Society Press: Urbana, IL, USA, 2013, p 443.
- (18) Servili, M., Montedoro, G. *European Journal of Lipid Science and Technology* **2002**, 104, 602.
- (19) Clayden, G., Warren and Wothers , *Organic Chemistry*; Vol. 311-312.
- (20) Stergiou, P.-Y., Foukis, A. et al , *Biotechnology Advances* **2013**, 31, 1846.
- (21) Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. *Lebensmittel-Wissenschaft &*

Technologie **1995**, 28, 25.

(22) Foti, M. C.; Daquino, C.; Geraci, C. *Journal of Organic Chemistry* **2004**, 69, 2309.

(23) Williams, K. A. *Oils, Fats and Fatty Foods: Their Practical Examination*; 4th ed.; J. A. Churchill: London, UK, 1996.

(24) Paiva-Martins, F.; Santos, V.; Mangericão, H.; Gordon, M. H. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **2006**, 54, 3738.

(25) Pastoriza-Gallego, M. J.; Sánchez-Paz, V.; Losada-Barreiro, S.; Bravo-Díaz, C.; Gunaseelan, K.; Romsted, L. S. *Langmuir* **2009**, 25, 2646.

(26) Jacobsen, C.; Schwarz, K.; Stöckmann, H.; Meyer, A. S.; Adler-Nissen, J. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **1999**, 47, 3601.

(27) Losada-Barreiro, S.; Sánchez-Paz, V.; Pastoriza-Gallego, M. J.; Bravo-Díaz, C. *Helvetica Chimica Acta* **2008**, 91, 21.

(28) Savelli, G.; Germani, R.; Brinchi, L. In *Reactions and Synthesis in Surfactant Systems*; Texter, J., Ed.; Marcel-Dekker: New York, USA, 2001.

(29) Fendler, J. In *Conference on supermolecules: biological and chemical aspects*; Wiley: Rome, Italy, 1984.

(30) Fendler, J. H.; Fendler, E. F. *Catalysis in Micellar and Macromolecular Systems*; Academic Press: New York, 1975.

(31) Zana, R. *Surfactant Solutions: New Methods for Investigation*; Marcel Dekker: New York, 1985.

(32) Binks, P. *Modern Aspects of Emulsion Science*; The Royal Society of Chemistry: Cambridge, 1998.

(33) McClements, D. J. *Food Emulsions: principles, practice and techniques*; CRC Press: Boca Raton, 1999.

(34) Reis, B.; Martins, M.; Barreto, B.; Milhazes, N.; Garrido, E. M.; Silva, P.; Garrido, J.; Borges, F. *Journal of Agriculture Food Chemistry* **2010**, 58, 6986.

(35) Yoshida, H. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1993**, 62, 41.

(36) Losada-Barreiro, S.; Sánchez Paz, V.; Bravo Díaz, C.; Paiva Martins, F.; Romsted, L. S. *Journal of Colloid and Interface Science* **2012**, 370, 73.

(37) Zambiasi, R. C.; Przybylski, R.; Zambiasi, M. W.; Mendonça, C. B. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos* **2007**, 25, 111.

(38) Costa, M.; Losada-Barreiro, S.; Paiva-Martins, F.; Bravo-Díaz, C.; Romsted, L. S. *Food Chemistry* **2015**, 175, 233.

(39) Losada-Barreiro, S.; Bravo Díaz, C.; Paiva Martins, F.; Romsted, L. S. *Journal of Agriculture Food Chemistry* **2013**, 61, 6533.

(40) Almeida, J.; Losada-Barreiro, S.; Costa, M.; Paiva-Martins, F.; Bravo-Díaz, C.; Romsted, L. S. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **2016**, 64 5274.